

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS -DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA -

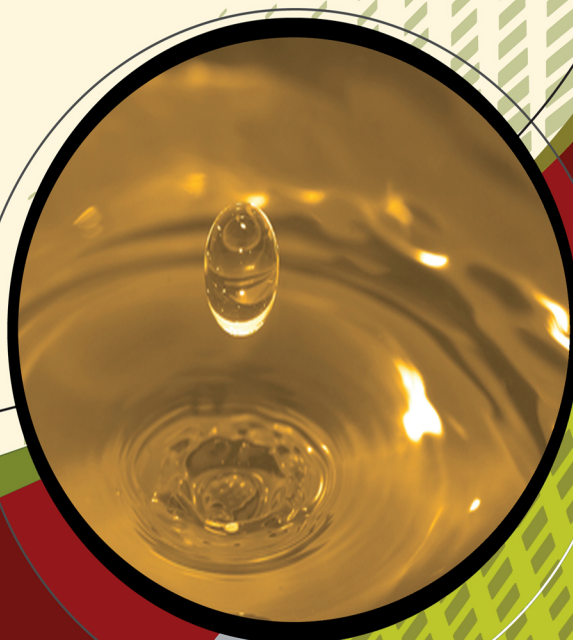
SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN (CIAL)



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID**

CIAL



**"DESARROLLO Y APLICACIÓN DE MODELOS DE DIGESTIÓN
INTESTINAL IN VITRO EN LA EVALUACIÓN DE LÍPIDOS BIOACTIVOS"**

**" DEVELOPMENT AND APPLICATION OF IN VITRO INTESTINAL
MODELS IN THE EVALUATION OF BIOACTIVE LIPIDS "**

ENERO 2015

MARÍA INÉS MORÁN VALERO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)



CIAL



**“DESARROLLO Y APLICACIÓN DE MODELOS DE
DIGESTIÓN INTESTINAL *IN VITRO* EN LA
EVALUACIÓN DE LÍPIDOS BIOACTIVOS”**

MARÍA INÉS MORÁN VALERO

Tesis Doctoral

Madrid, Enero 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación

**“DESARROLLO Y APLICACIÓN DE MODELOS DE
DIGESTIÓN INTESTINAL *IN VITRO* EN LA
EVALUACIÓN DE LÍPIDOS BIOACTIVOS”**

Memoria presentada por:

María Inés Morán Valero

Para optar al grado de

DOCTOR EN BIOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Carlos F. Torres Olivares

(Universidad Autónoma de Madrid)

Dra. Diana Martín García

(Universidad Autónoma de Madrid)

El Dr. Carlos F. Torres Olivares, Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid y la Dra. Diana Martín García, Profesor Ayudante Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid

INFORMAN:

Que el presente trabajo titulado: “Desarrollo y aplicación de modelos de digestión intestinal *in vitro* en la evaluación de lípidos bioactivos” y que constituye la memoria que presenta Dña. María Inés Morán Valero para optar al grado de Doctor en Biología y Ciencias de la Alimentación, ha sido realizado en la Universidad Autónoma de Madrid bajo su dirección.

Y para que así conste firman el presente informe en Madrid a Fecha

Fdo: Carlos F. Torres Olivares

Fdo: Diana Martín García



“La educación es el arma
más poderosa que se
puede utilizar para
cambiar el mundo”
(Nelson Mandela)

"Luchar siempre,
vencer tal vez,
desistir jamás"
(Mestre Tubarão)



ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	16
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	21
1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	26
1.1. INGREDIENTES LIPÍDICOS BIOACTIVOS.....	27
1. 1. 1. LOS LÍPIDOS EN LA DIETA.....	27
1. 1. 2. LÍPIDOS BIOACTIVOS.....	28
1. 1. 2. 1. ÁCIDOS GRASOS.....	28
a) Ácidos Grasos de Cadena Corta (SCFA).....	29
b) Ácidos Grasos de Cadena Larga (LCFA).....	31
1. 1. 2. 2. ACILGLICEROL Y ALQUILGLICEROL.....	34
a) Triglicéridos.....	36
b) Glicéridos parciales.....	36
c) Alquilglicéridos.....	37
1. 1. 2. 3. ESTEROLES.....	39
a) Esteroides de origen animal.....	40
b) Esteroides de origen vegetal.....	41
1. 1. 2. 4. FOSFOLÍPIDOS.....	43
1. 1. 3. LÍPIDOS COMO VEHÍCULOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	45

1.2. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LOS LÍPIDOS.....	48
1. 2. 1. ASPECTOS GENERALES.....	48
1. 2. 2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DURANTE LA DIGESTIÓN.....	51
1.2.2.1. DIGESTIÓN DE ACILGLICEROLAS.....	51
1.2.2.2. DIGESTIÓN DE ÉSTERES DE ESTEROL.....	52
1.2.2.3. DIGESTIÓN DE FOSFOLÍPIDOS.....	54
1. 2. 3. ABSORCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DIGESTIÓN.....	55
1.3. MODELOS DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>.....	58
1.3.1. TIPOS DE MODELOS DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	59
1.3.2. PARÁMETROS DE LOS MODELOS DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	60
1. 4. BIBLIOGRAFÍA.....	65
 2. CAPÍTULO II: OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	 79
2. 1. OBJETIVOS.....	80
2. 2. PLAN DE TRABAJO.....	82
2.3. BIBLIOGRAFÍA.....	83
 3. CAPÍTULO III: “DESARROLLO DE UN MODELO DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i> PARA ACILGLICEROLAS Y SU APLICACIÓN A ALQUILGLICEROLAS ESTERIFICADOS CON ÁCIDO BUTÍRICO”	 86
3. 1. INTRODUCCIÓN.....	87

3. 2. OBJETIVOS.....	88
3. 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	89
3. 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
3. 4. 1. DESARROLLO DEL MODELO DE DIGESTIÓN INTESTINAL <i>IN VITRO</i>	95
3. 4. 2. DIGESTIÓN INTESTINAL <i>IN VITRO</i> DE ALQUILGLICEROL DIESTERIFICADO.....	101
3. 4. 3. BIOACCESIBILIDAD DE ALQUILGLICEROL DIESTERIFICADO.....	106
3. 4. 4. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE ALQUILGLICEROL DIESTERIFICADO DIGERIDO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON.....	109
3. 5. CONCLUSIONES.....	114
3. 6. BIBLIOGRAFÍA.....	114
 4. CAPÍTULO IV: “APLICACIÓN DE UN MODELO DE DIGESTIÓN INTESTINAL <i>IN VITRO</i> DE ACILGLICEROLES EN EL ESTUDIO COMPARATIVO DE ACEITES RICOS EN 1,3-DIGLICÉRIDOS, 1- MONOGLICÉRIDOS O SUS MEZCLAS.”	 121
4. 1. INTRODUCCIÓN.....	122
4. 2. OBJETIVOS.....	125
4. 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	126
4. 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	130
4. 4. 1. IMPORTANCIA DEL FENÓMENO DE ACIL-MIGRACIÓN EN MODELOS DE DIGESTIÓN INTESTINAL <i>IN VITRO</i>	130
4. 4. 2. DIGESTIÓN INTESTINAL <i>IN VITRO</i> DE TRIOLEÍNA, DIOLEÍNA, MONOLEÍNA Y MEZCLA DIOLEÍNA: MONOLEÍNA.....	133

ÍNDICE GENERAL

4. 4. 3. BIOACCESIBILIDAD DE TRIOLEÍNA, DIOLEÍNA, MONOLEÍNA Y MEZCLA DIOLEÍNA: MONOLEÍNA.....	137
4.4.4. SELECCIÓN DE GLICÉRIDOS PARCIALES EN FUNCIÓN DE LOS PRODUCTOS 1-MONOGLICÉRIDO O 2-MONOGLICÉRIDO	139
4. 5. CONCLUSIONES.....	142
4. 6. BIBLIOGRAFÍA.....	143
5. CAPÍTULO V: DESARROLLO DE UN MODELO DE DIGESTIÓN IN VITRO PARA ÉSTERES DE ESTEROL Y SU APLICACIÓN A FITOSTEROLES ESTERIFICADOS CON ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO.....	150
5. 1. INTRODUCCIÓN.....	151
5. 2. OBJETIVOS.....	153
5. 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	153
5. 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	157
5. 4. 1. DESARROLLO DEL MODELO DE DIGESTIÓN INTESTINAL <i>IN VITRO</i> PARA ÉSTERES DE ESTEROL.....	157
5. 4. 2. DIGESTIÓN INTESTINAL <i>IN VITRO</i> DE FITOESTEROL ESTERIFICADO CON ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO.....	159
5. 4. 3. BIOACCESIBILIDAD DE FITOESTEROL ESTERIFICADO CON ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO.....	161
5. 4. 4. ESTUDIO DE LA BIOACCESIBILIDAD DEL COLESTEROL EN PRESENCIA DEL FITOESTEROL ESTERIFICADO CON ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO.....	163

5. 5. CONCLUSIONES.....	169
5. 6. BIBLIOGRAFÍA.....	170
 6. CAPÍTULO VI: DESARROLLO DE UN MODELO DE DIGESTIÓN IN VITRO PARA FOSFOLÍPIDOS Y SU APLICACIÓN A FOSFOLÍPIDOS ESTERIFICADOS CON HIDROXITIRO SOL.....	 176
6. 1. INTRODUCCIÓN.....	177
6. 2. OBJETIVOS.....	179
6. 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	180
6. 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	186
6. 4. 1. DESARROLLO DE UN MODELO DE DIGESTIÓN INTESTINAL <i>IN VITRO</i> PARA FOSFOLÍPIDOS.....	186
6. 4. 2. DIGESTIÓN INTESTINAL <i>IN VITRO</i> DE FOSFOLÍPIDO ESTERIFICADO CON HIDROXITIRO SOL.....	190
6. 4. 3. BIOACCESIBILIDAD DEL FOSFOLÍPIDO ESTERIFICADO CON HIDROXITIRO L.....	194
6. 4. 4. BIOACCESIBILIDAD DE HT.....	197
6. 4. 5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i> EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL FOSFATIDILHIDROXITIRO SOL.....	199
6. 5. CONCLUSIONES.....	200
6. 6. BIBLIOGRAFÍA.....	201

7. CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN CONJUNTA.....	206
7. 1. DESARROLLO DE MODELOS DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i> PARA DIFERENTES SUSTRATOS LIPÍDICOS.....	207
7. 1. 1. MODIFICACIONES DEL MODELO DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	209
7. 1. 2. MODIFICACIONES DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE COMPONENTES LIPÍDICOS.....	213
7. 1. 3. MODIFICACIONES DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	216
7. 2. APLICACIÓN DE MODELOS DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i> EN LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOACTIVO DE LÍPIDOS.....	220
7. 3. BIBLIOGRAFÍA.....	224
 8. CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES GENERALES.....	 229
9. ANEXO: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	233

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería dar las gracias al Dr. Guillermo Reglero Rada por haberme dado la oportunidad de iniciar mi carrera científica, permitiéndome formarme profesionalmente en el Grupo de Investigación de Ingredientes Alimentarios Funcionales de la Universidad Autónoma de Madrid. Gracias por su dedicación plena al grupo de investigación, por su confianza en todos nosotros y por su trabajo dentro del mundo de la investigación.

Dar las gracias al Dr. Carlos Torres, por llevar a cabo la dirección de esta Tesis, por su paciencia, disponibilidad y por todo cuanto me ha enseñado a lo largo de estos años.

Agradecer a la Dra. Diana Martín toda su dedicación, trabajo, esfuerzo, compromiso y cercanía conmigo durante estos años de intenso trabajo y aprendizaje. Su persistencia, buenos hábitos y calidad de trabajo han permitido el desarrollo de la presente Tesis, junto a mi crecimiento personal como investigadora.

Dar las gracias a la Dra. M^a Victoria Moreno Arribas, Directora del CIAL, por permitirme disponer de los servicios ofrecidos por el centro.

Agradecer al resto de doctores y profesores del Área de Ciencias de la Alimentación de la UAM su trato cercano y amable, y por dejar que aprendiera un poco de cada uno de ellos. En especial al Dr. Luis Vázquez por ser la persona que me inicio en el mundo de la investigación, y a la Dra. Montserrat González, por ayudarme en todo tipo de gestiones que he tenido que llevar a cabo durante mis años de trabajo en el grupo de investigación.

Dar las gracias a la Dra. Ana Ramírez y al grupo IMDEA Alimentación, en especial a la Dra. Susana Molina, por realizar una importante colaboración con el grupo de investigación para el desarrollo del trabajo llevado a cabo con el Alquilglicerol diesterificado con ácido butírico en cultivos celulares.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la Dra. Susana Santoyo, Directora de la Sección Departamental Ciencias de la Alimentación, su trabajo en la coordinación de los estudios de postgrado del departamento, gracias a los cuáles pude comenzar mi actividad investigadora.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio por los innumerables momentos vividos dentro y fuera del trabajo, a la pequeña Mayka, David, Erika, María, Alicia, Laila, Ana María, Bea, Elena y Alexis. Quería hacer una mención especial a mis “chicos”, Gonzalo, Dani, Víctor, Óscar y Guzman, y a la pequeña Albita, por todos los buenos momentos vividos durante las largas jornadas de trabajo en el laboratorio, esas risas compartidas y esos buenísimos desayunos del CBM. Hacer mención a todos los compañeros del grupo de investigación de “Foodomics”, por compartir conmigo innumerables charlas durante todos estos años de trabajo. Para mí habéis sido y sereis unos grandes compañeros dentro del trabajo. Quería terminar dándoles las gracias a Juanan y a Anne, simplemente por haberles conocido y por compartir todos los momentos de confesiones, risas, ida y venidas que hemos vivido juntos.

Dar las gracias a todos mis compañeros del gimnasio de Jesús del Moral, gracias por ese apoyo incondicional del “gym-power” que siempre me ha ayudado mucho a seguir con tantas ganas! Gracias por cuidar tanto de la pequeñaja del grupo, y por haberme hecho y hacerme vivir tantísimos buenos momentos. Sois geniales!

Gracias a mi nueva familia de “crossfit”, por hacerme descargar toda la adrenalina de días de agobio y estrés, sois una buenísima terapia y unos grandísimos compañeros!

Gracias a todos mis buenos y grandes amigos de la Capoeira, en especial a toda mi familia de ACDP, por vuestra paciencia y preocupación conmigo, por esos miles de entrenos que me hacen cada día volver a casa con las pilas renovadas para el día siguiente hacer frente a otro día de trabajo. Especialmente dar las gracias a mi amigo Manteiga, por hacer de mi psicólogo personal a parte de mi acupuntor, ya sabes cuanto me has ayudado en épocas difíciles, y a mi compañero Camaleão, por

ser un ejemplo para mí en muchos aspectos de la vida, por compartir sus experiencias doctorales conmigo y por darme consejos realmente valiosos, sabes lo mucho que te admiro, y por supuesto, cuantísimo te aprecio! También quería hacer una pequeña mención a las “Nancys Rubias”, por preocuparse tanto de mí siempre, por hacerme vivir tantísimos buenos momentos y por sacar la mejor de mis sonrisas. Sois increíbles chicas! Finalmente, quería hacer una mención especial a las dos personas que más me han tenido que aguantar durante estos 4 años, darles las gracias por sus consejos, por su comprensión, por sus regañinas constructivas, por su infinita paciencia y por estar a mi lado siempre que les he necesitado, día a día, por ser mis confidentes, amigos y casi mis hermanos, sabéis lo importantes que habéis sido para mí durante esta época de mi vida, Dani y Mer, gracias!

Gracias a mis amigos y compañeros de toda la vida del pueblo (Rillo de Gallo), por estar conmigo aún sin estarlo diariamente, han sido y siempre serán un apoyo incondicional en todo.

Agredercer a toda mi familia el apoyo y la confianza que han depositado en mí durante todos los años de mi vida, a mis padres Andrés y Rosa, por ser un ejemplo de vida para mí, por haberme apoyado en todas las decisiones tomadas y por animarme día a día a seguir luchando por mis sueños. Gracias a mi hermano Andrés, por haberme aguantado durante muchos años, y por que me aguante muchísimos más, gracias por ser hermano, amigo y consejero de vida. Y gracias a mi abuelo Antonio, por ser para mí el mayor ejemplo de hombre luchador que he conocido y conoceré. Sabes lo importante que eres para mí y lo feliz que soy de que puedas compartir conmigo un capítulo de mi vida tan especial.

Dar las gracias a la Universidad Autónoma de Madrid por la concesión de las becas de “Ayudas de postgrado”, a la Fundación de la Universidad Autónoma de Madrid (FUAM) por la concesión de una beca de “Ayuda predoctoral” y al Ministerio de Ciencia e Innovación por el contrato como técnico de laboratorio dentro del programa INNPACTO, que han permitido el desarrollo de la presente Tesis doctoral, así como mi formación investigadora.

AGRADECIMIENTOS

Finalmente, dar las gracias a todas las personas que de una manera u otra han contribuido en el desarrollo de esta Tesis doctoral, creyendo plenamente en mí y en mi capacidad investigadora.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AKG = Alquilglicerol sin esterificar

Cho= Colesterol

CLA= Ácido Linoleico Conjugado

CVD= Enfermedades Cardiovasculares

DB = Dibutirina

DG= Diglicéridos

DHA= Ácido docosaheptaenoico

DMEM= Medio de cultivo Dulbecco's modificado

DO= Dioleína

D-AKG= Alquilglicerol diesterificado

D-SCAKG= Alquilglicerol diesterificado con ácido grasos de cadena corta

EPA = Ácido Eicosapentaenoico

FA= Ácido graso

FFA= Ácido graso libre

GC= Cromatografía de gases

HPLC= Cromatografía de Líquidos de Alta Presión

HT= Hidroxitirosol

IAF-UAM= Grupo de investigación de Ingredientes Alimentarios Funcionales de la Universidad Autónoma de Madrid

LA= Ácido Linoleico

LCFA= Ácidos grasos de cadena larga

LISTADO DE ABREVIATURAS

MB= Monobutirina

MCFA= Ácidos grasos de cadena media

MG= Monoglicérido

M-SCAKG= Alquilglicerol monoesterificado con ácido graso de cadena corta

MO= Monoleína

MP= Fase Micelar

MS= Espectometría de Masas

OP= Fase Oleosa

PAF= Factor activador de plaquetas

PE= Fitoestanol

PHT= Fosfatidilhidroxitirosol

PL= Fosfolípido

PLA₂= Fosfolipasa A2

PP= Fase Precipitado

PS= Fitoesterol

PUFA= Ácidos grasos poliinsaturados

SB= Sales Biliares

SCAKG= Alquilgliceroles de cadena corta

SCFA= Ácidos grasos de cadena corta

SPE= Extracción en fase sólida

ST= Esteroles

TB= Tributirina

TG= Triglicérido

TNF- α = Factor alfa de necrosis tumoral

TO= Trioleína

*A mis padres, a mi abuelo
y a mi hermano,....*

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I: “INTRODUCCIÓN”

1.1. INGREDIENTES LIPÍDICOS BIOACTIVOS

1.1.1. Los lípidos en la dieta

Los lípidos son moléculas orgánicas, principalmente formadas por carbono e hidrógeno y en menor medida por oxígeno, aunque también pueden contener azufre, fósforo y nitrógeno en su estructura. Su característica principal es que son moléculas hidrófobas, es decir, insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos (1).

Los compuestos lipídicos son nutrientes esenciales e indispensable para el equilibrio alimentario, debido a su papel fundamental en el organismo. Intervienen en múltiples funciones metabólicas esenciales, proporcionan un aporte calórico importante de la dieta y participan como elementos estructurales en las membranas. Su consumo es necesario debido a la participación de los mismos en el correcto funcionamiento del sistema nervioso y del aparato cardiovascular. Además, se encuentran implicados en múltiples funciones fisiológicas en las que participan como mediadores de señales intra e intercelulares, como son las hormonas, los eicosanoides y algunos factores de transcripción. También es importante recordar que son los responsable del transporte de las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) (1- 3).

Durante muchos años, la percepción que se ha tenido de los lípidos ha sido bastante negativa, debido a su relación con diferentes enfermedades y desórdenes crónicos como son la obesidad, la diabetes, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (CVD). Por este motivo, en los últimos años los lípidos han sido objeto de muchos trabajos científicos, en los cuales se ha podido determinar que no sólo son imprescindibles para un correcto funcionamiento del organismo, sino que consumidos en una dosis adecuada, dependiendo del tipo de lípido, podrían ser compuestos saludables (1-5). Existen diversos estudios que han corroborado

que es necesario ingerir una dieta con un perfil lipídico adecuado para asegurar que el organismo pueda funcionar de manera correcta a lo largo de la vida (4-6).

1.1.2. Lípidos bioactivos

El término bioactivo en el campo de la alimentación, y específicamente en el ámbito de los alimentos funcionales, se define para aquellos compuestos químicos que ejercen un efecto beneficioso para alguna función corporal del individuo, produciendo una mejora en su estado de salud o bienestar, o reduciendo el riesgo de padecer alguna enfermedad (6). En el caso concreto de los lípidos bioactivos se hace referencia a las moléculas de carácter lipídico que ejercen un efecto beneficioso para la salud (5).

Dentro de los compuesto lipídicos, los triglicéridos (TG) son los componentes mayoritarios en la naturaleza, seguidos por los fosfolípidos (PL), los esteroides (ST) y otros compuestos minoritarios como glicéridos parciales, alquilglicerol, o vitaminas liposolubles y sus precursores (1). En la actualidad, se están llevando a cabo diferentes estudios sobre las propiedades funcionales o beneficiosas de estos componentes lipídicos de la dieta, más allá de su simple valor nutricional o fisiológico, en la prevención y tratamiento de algunas patologías crónicas, como las CVD, el cáncer o las enfermedades de naturaleza autoinmune (7, 8).

1.1.2.1. Ácidos Grasos

Los ácidos grasos (FAs) son biomoléculas de naturaleza lipídica, formados por una cadena lineal hidrocarbonada de diferente número de átomos de carbono y con un grupo carboxilo en el extremo (son ácidos orgánicos monocarboxílicos). Se encuentran formando parte de la estructura de la mayoría de los compuestos lipídicos, tanto de los TG, los diglicéridos (DG) y los monoglicéridos (MG), como de PLs, o de los ésteres de STs (3).

Los FAs pueden llevar en su estructura dobles enlaces (FAs insaturados) o no llevarlos (FAs saturados), que les proporcionarán diferentes características

estructurales, físicas (extensibilidad, plasticidad y consistencia) y químicas (cristalización, punto de fusión), así como diferentes propiedades bioactivas. Los FAs presentan un papel biológico muy definido en la naturaleza, participando principalmente en tres funciones fisiológicas imprescindibles para el correcto funcionamiento de los organismos vivos, como son las funciones energética, estructural y reguladora (1-3).

Por otro lado, independientemente del grado de saturación, los FAs pueden clasificarse en función de su número de átomos de carbono, pudiendo ser de cadena corta (SCFAs), de cadena media (MCFAs) o de cadena larga (LCFAs). Dado el interés particular de la presente Tesis en determinados SCFAs o LCFAs, estos grupos de FAs se comentarán a continuación en mayor detalle.

a) Ácidos grasos de cadena corta

Son considerados como SCFAs aquellos que tienen en su estructura de 2 a 6 átomos de carbono. Los principales SCFAs son el ácido acético (C2:0), el ácido propiónico (C3:0) y el ácido butírico (C4:0). Estos FAs se encuentran en diversas fuentes en la naturaleza. La leche y algunos productos lácteos, como la mantequilla, contienen determinadas cantidades de ácido butírico (9). Por otro lado, de la fermentación de los productos lácteos se obtiene el ácido propiónico, ampliamente utilizado en la industria alimentaria como conservante (10). Por su parte, el ácido acético se obtiene de la fermentación, llevada a cabo por bacterias del género acetobacter, de diferentes alimentos alcohólicos como son el vino, la sidra o los cereales fermentados (11). Por otro lado, a nivel sistémico, los SCFAs son liberados de la fermentación de los azúcares no digeridos y de la fibra dietética llevada a cabo por la flora bacteriana intestinal a lo largo de todo el intestino grueso (12).

Entre las principales funciones biológicas que se han podido estudiar de los SCFAs, se ha visto que podrían tener determinadas propiedades relacionadas con el aumento del flujo vascular, y con la motilidad y absorción de sodio a nivel intestinal. Por otro lado, se ha observado que podrían estimular la secreción de la

mucosa intestinal y que podrían tener determinadas propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas. Además, se ha descrito que la ausencia de estos SCFAs podría provocar la inflamación de la mucosa colorrectal (13).

Ácido Butírico

Es el SCFA de mayor relevancia a nivel del intestino grueso, debido a su importante papel como sustrato de energía para las células del colon, así como su papel en el control de la inflamación colónica.

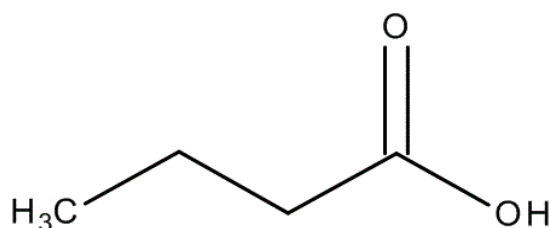


Figura 1. Molécula de ácido butírico

Hoy en día, el ácido butírico (Figura 1) es un importante foco de estudio debido a que es capaz de producir una serie de efectos beneficiosos para el organismo.

- *Efecto anticancerígeno.* El ácido butírico interviene en la patogénesis de diversos cánceres, como el cáncer colorrectal, el hepatocarcinoma, en el cáncer de mama, la leucemia y el cáncer de próstata. Se ha podido observar que el ácido butírico es capaz de inhibir la proliferación celular e inducir la diferenciación y apoptosis de células en líneas celulares de cáncer (14, 15). A nivel molecular se ha estudiado que el ácido butírico podría regular la expresión génica mediante la inhibición de la histona deacetilasa, modulando así a varias proteínas implicadas en el control del ciclo celular (16). Asimismo, se ha observado que podría inactivar la expresión de oncogenes y regular la respuesta al estrés celular (17).
- *Efecto antiinflamatorio.* Se manifiesta a nivel del colon debido a la acción del ácido butírico sobre la mucosa. Se ha observado que el butirato podría

ser capaz de aumentar la producción de mucina y de proteínas, y reducir la secreción de ciertos mediadores pro-inflamatorios (TNF- α) (18, 19), los cuales participan activamente sobre el proceso de inflamación. Además, se ha estudiado que podría inhibir la adhesión de leucocitos al endotelio, aumentando la liberación de IL-10 y reduciendo la expresión del receptor intestinal TLR4, factor cuya expresión se ha visto que es elevada en enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (19, 20).

- *Otros efectos.* Se ha observado que el ácido butírico podría actuar como regulador de la reproducción de colonocitos, lo que proporcionaría un aporte positivo en el mantenimiento de la flora colónica (14). Además, podría actuar como regulador de la absorción de agua y electrolitos, lo que permitiría mantener el equilibrio homeostático del intestino grueso (20).

b) Ácidos grasos de cadena larga

Los LCFAs tienen en su estructura 16 o más átomos de carbono, pudiendo ser tanto saturados como insaturados. Dentro de este amplio grupo de FAs destacan particularmente por su relevancia biológica y bioactividad los FAs insaturados, principalmente aquellos que presentan varios dobles enlaces en su estructura, denominados PUFAs.

Los PUFAs hoy en día son un importante foco de estudio, debido a la gran cantidad de propiedades saludables para el organismo que se ha observado que presentan. Entre los PUFAs más estudiados actualmente se encuentran dos familias, los denominados omega-3 (ω 3) y omega-6 (ω 6), algunos de los cuales son FAs esenciales para el organismo, es decir, deben ser consumidos en la dieta ya que el organismo humano no es capaz de sintetizarlos (21). Entre los beneficios descritos en la bibliografía para los ω 3 y para los ω 6 destacan el potencial efecto anticancerígeno frente a diferentes tipos de cánceres y el potencial efecto antiinflamatorio, junto a la disminución de incidencia de CVD y la disminución de la presión arterial (21, 22). Además de estos ácidos grasos, existen otros PUFAs

que han cobrado un gran interés en las últimas décadas debido a sus propiedades bioactivas, destacando el caso particular de los ácidos linoleicos de tipo conjugado, como se detallarán a continuación.

Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

Los ácidos linoleicos conjugados o CLAs, constituyen una familia de 28 isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico (LA), un ácido de 18 átomos de carbono que posee dos dobles enlaces en su estructura. Normalmente, las parejas de dobles enlaces en los ácidos grasos tienen un grupo metilo entre ambos enlaces, pero en el caso de los ácidos grasos conjugados, los dobles enlaces se encuentran separados únicamente por un enlace simple (Figura 2). Además pueden presentar configuración *-cis* ó *-trans*, las cuáles se distinguen según la orientación de la cadena hidrocarbonada hacia el mismo lado del doble enlace (*-cis*), o hacia el lado opuesto del doble enlace (*-trans*).

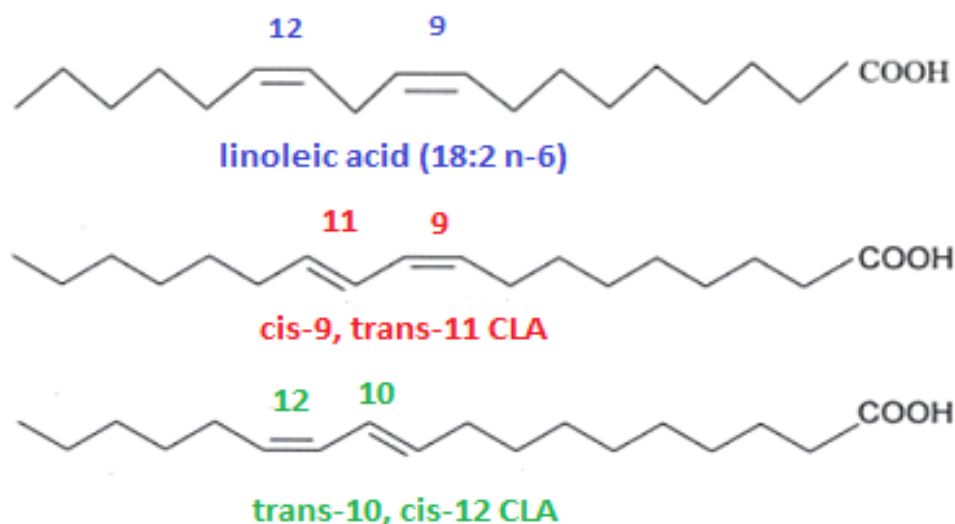


Figura 2. Estructura del ácido linoleico junto a dos isómeros del ácido linoleico conjugado

Existe una gran mezcla de isómeros dentro de la familia de los CLA. La diferencia entre ellos radica en las posiciones en las que se encuentran los dobles

enlaces y en la configuración de esos dobles enlaces, que pueden ser *cis-trans*, *trans-cis*, *cis-cis* y *trans-trans*. Dentro de esta gran familia de isómeros destacan dos de ellos, el *cis-9*, *trans-11* (isómero mayoritario) y el *trans-10*, *cis-12*, debido a que son el principal foco de las investigaciones científicas hoy en día (23, 24).

Se pueden encontrar en la bibliografía diferentes trabajos en relación al estudio de las principales propiedades bioactivas del CLA (25-32), entre las cuales destacan:

- *Prevención de CVD*. Se ha observado que el CLA podría reducir lesiones ateroscleróticas, disminuir los niveles de colesterol (Cho) total, de TG y de Cho LDL, y aumentar los niveles de Cho HDL (25). Asimismo, se ha observado que podría disminuir la presión arterial (26) y aumentar la frecuencia cardíaca, sin presentar cambios en la agregación plaquetaria (27).
- *Reducción de la grasa corporal*. Se trata de uno de los aspectos que más atención ha suscitado en los últimos años en cuanto al CLA. Se ha estudiado que el isómero *trans-10 cis-12* podría ser el responsable de esta actividad (28). Se piensa que la reducción de la grasa corporal sería el resultado de diferentes mecanismos, como podrían ser un aumento del gasto energético, una reducción de la acumulación de lípidos en el tejido adiposo, un aumento de la apoptosis de los adipocitos y de la modulación de adipocinas y citocinas, y un aumento de la β -oxidación (28).
- *Actividad anticancerígena*. El CLA podría ser capaz de reducir la iniciación, promoción y progresión de algunos tipos de cánceres, como el cáncer de piel, de mama, de estómago, de colon y de hígado (29). Se ha estudiado también que podría reducir la metástasis de estos cánceres, actuando en la reducción de la producción de eicosanoides, interfiriendo en las vías de señalización celular e inhibiendo la síntesis de ADN (29).
- *Respuesta inmune e inflamatoria*. El CLA podría tener ciertas propiedades antiinflamatorias en relación a la reducción de la inflamación del colon. Se ha evaluado su posibilidad de disminuir la producción de citocinas inducidas por antígeno y su posibilidad de modular la producción de

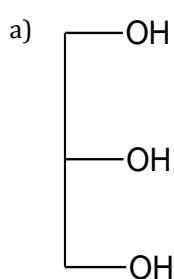
citocinas, prostaglandinas y leucotrienio B4 (25,30). Por otro lado, se ha estudiado que el CLA podría mejorar la respuesta inmune a través de la modulación del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) (30, 31).

- *Mejora de la masa ósea.* Algunos estudios afirman que el CLA podría mejorar la masa ósea, basándose en datos de peso de las cenizas, en datos de contenido mineral del hueso, en la longitud del hueso, en la densidad ósea, en el peso de hueso seco o en el contenido de calcio, magnesio y fósforo (32, 33).

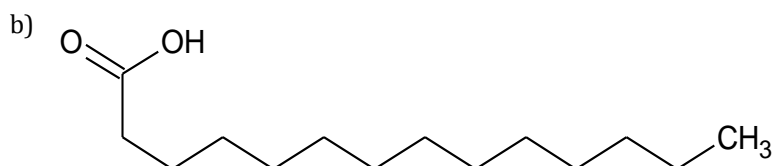
1.2.2. 2. Acilgliceroles y alquilgliceroles

Los acilgliceroles son ésteres de FAs unidos a una molécula de glicerol. La molécula de glicerol puede llegar a reaccionar con uno, dos o con tres FAs, debido a la presencia de 3 grupos hidroxilo en su estructura (2, 3). Así, según el número de FAs que lleva esterificados las moléculas de glicerol se pueden denominar (4):

- *Monoacilgliceroles* (MG): solamente llevan esterificado un FA a la molécula de glicerina.
- *Diacilgliceroles* (DG): llevan esterificados dos FAs a la molécula de glicerina.
- *Triacilgliceroles* (TG): llevan esterificados tres FAs a la molécula de glicerina.



Glicerol



Ácido graso libre

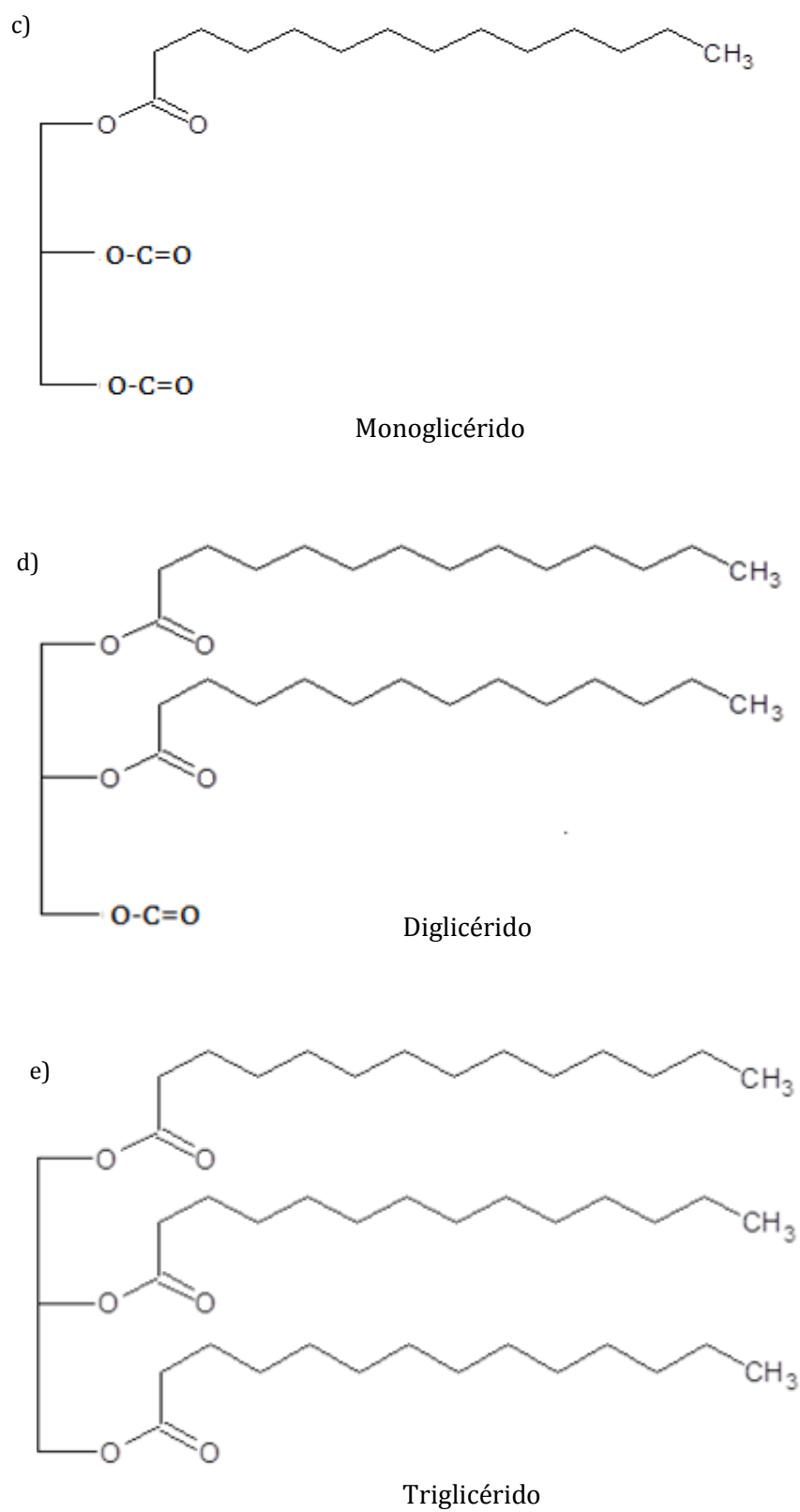


Figura 3. Estructura del glicerol (a), estructura de un FFA (b) y las diferentes estructuras a las que pueden dar lugar tras una reacción de esterificación: MG (c), DG (d) y TG (e).

Cada uno de los acilglicerolos (figura 3) mencionados anteriormente puede llevar a cabo diversas funciones (estructurales, energéticas, y reguladoras) específicas en el organismo.

a) Triglicéridos

Se trata del mayor componente lipídico de los tejidos, además del mayormente consumido en la dieta, el cual tiene unas funciones biológicas muy específicas en los organismos vivos, como son actuar como reserva energética, aislante térmico, o proporcionar protección mecánica (1).

En cuanto a las funciones bioactivas de los TG, estas se van a deber principalmente a la composición y posición de los FAs que lleven esterificados en su estructura, residiendo en el acilglicerol la importancia de vehiculizar de una manera efectiva dicho FA bioactivo.

b) Glicéridos parciales

Los DG y MG se conocen habitualmente como “glicéridos parciales”, debido a que se tratan de productos liberados de la hidrólisis parcial de los TG. Actualmente son muy utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, debido al especial interés en sus funciones, tanto tecnológicas como biológicas (4). Desde el punto de vista tecnológico, los glicéridos parciales son emulgentes de especial interés, bastante utilizados en gran diversidad de productos alimentarios. Desde el punto de vista biológico, los glicéridos parciales parecen estar implicados en la transducción de señales, podrían ser fuente de prostaglandinas, precursores de la endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol y activadores de una subfamilia de receptores TRPC3/6/7 (34).

Por otro lado, desde el punto de vista bioactivo, los glicéridos parciales están siendo compuestos lipídicos de especial interés en los últimos años, debido a las funciones que se ha observado que podrían desempeñar en el organismo, entre las cuales se destaca las siguientes:

- *Efecto hipocalórico de las formas 1,3-DG y 1(3)-MG.* Se ha observado que estas formas lipídicas particulares son capaces de reducir el peso y la grasa corporal, así como los TG en sangre, aumentando el gasto energético en el organismo. Aunque el efecto bioactivo de estos productos no está claramente establecido, la hipótesis que se ha manejado estaría relacionada con el metabolismo particular de estos glicéridos parciales en los enterocitos, que resulta en una menor formación de quilomicrones y un aumento de la β -oxidación de FA (35, 36).
- *Antioxidante, anti-aterogénico y antidiabético.* Por otro lado, en la bibliografía se encuentran descritos trabajos donde se han estudiado otras propiedades bioactivas particulares del MG esterificado con ácido oleico (monoleína, MO) (37). En el trabajo de Takeno et al (37) se describe a través de ensayos *in vitro* y de ensayos celulares las propiedades antioxidantes, anti-aterogénicas y antidiabéticas de la MO. Por otro lado, Feltes et al (38) describieron que tanto el 1-MG como el 2-MG pueden ser capaces de evitar un incremento de la insulina en sangre después de la ingesta, controlando la prevención de la obesidad y la diabetes (38).

c) Alquilglicerol

Los alquilglicerol son unos componentes lipídicos con estructura similar a la de los acilglicerol, en los que al menos uno de los enlaces ésteres en la molécula glicerol es reemplazado por un enlace éter. A su vez, en el resto de las posiciones de la glicerina, estos alquilglicerol pueden llevar esterificados uno o dos FAs en las posiciones *sn*-2 y *sn*-3 (figura 4). Así, su clasificación, basándose en el número de FAs que los esterifican, es parecida a la de los acilglicerol (39, 40):

- *Sin esterificar (AKG):* no llevan esterificado ningún FA a la estructura del alquilglicerol
- *Monoesterificados (M-AKG):* llevan esterificado un FA a la estructura del alquilglicerol

- *Diesterificados (D-AKG):* llevan esterificados dos FAs a la estructura del alquilglicerol.

Los FAs más comunes que se pueden encontrar esterificados a estos alquilglicerol son los C16:0, C18:0 y C18:1, que dan lugar a sus correspondientes alquilglicerol; los cuales se conocen comúnmente como 1-O-hexadecilglicerol o “alcohol químico”, 1-O-octadecilglicerol o “alcohol batílico” y 1-O-octadec-9-enil glicerol o “alcohol selachílico” respectivamente.

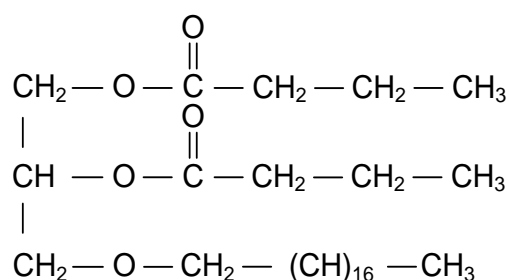


Figura 4. Molécula de alquilglicerol (batil alcohol)

Estos derivados lipídicos se encuentran principalmente en el aceite de hígado de tiburón, un aceite utilizado durante los últimos años como agente terapéutico y preventivo de determinadas enfermedades, debido principalmente a su composición en alquilglicerol (40). Por otro lado, se encuentran presentes de forma minoritaria en prácticamente todos los tejidos, principalmente en aquellos que son portadores de células inmunitarias como el hígado, el bazo, la médula ósea, los glóbulos rojos y los ganglios linfáticos. Asimismo, se encuentran formando parte de los lípidos plasmáticos y en la leche materna, donde se han encontrado valores de hasta diez veces más que en la leche de vaca (39).

Los alquilglicerol han sido foco de atención de diversos estudios en los últimos años (40, 41), debido a las propiedades bioactivas que presentan:

- *Estructura similar a los factores de activación plaquetaria.* Por este motivo se ha observado que podrían prevenir determinadas

enfermedades como el asma, la psoriasis, la artritis y la eliminación de metales pesados del cuerpo (40).

- *Agentes antineoplásicos.* Se ha observado que podrían inhibir el crecimiento celular y podrían mostrar una actividad antimetastásica, induciendo la diferenciación y apoptosis de células de cáncer (40).
- *Estimulación inmunológica.* Existen estudios sobre la participación de los alquilglicerol en la actividad inmuno-estimuladora, actuando sobre los macrófagos, además de sobre los linfocitos B y T. Otro efecto que se ha observado que podrían tener es la producción de anticuerpos, principalmente de inmunoglobulinas G y M (40).
- *Aumento de la movilidad del espermatozoide.* Se ha estudiado que los alquilglicerol podrían mejorar la movilidad del espermatozoide y la fertilidad (41).

Debido a todas estas propiedades biológicas y/o bioactivas de los alquilglicerol, se ha planteado su administración como terapia complementaria en el tratamiento de desórdenes neoplásicos y como potenciadores del sistema inmune en distintas enfermedades infecciosas (40).

1.1.2.3. Esteroides

Los STs (figura 5) son esteroides de 27 a 29 átomos de carbono pertenecientes a la fracción lipídica no saponificable. Su estructura química deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, una molécula de 17 átomos de carbono formada por tres anillos hexagonales y uno pentagonal (1-4).

Al carbono 17 se le une una cadena lateral de 8 o más átomos de carbono, encontrándose un alcohol o hidroxilo (OH) unido al carbono 3.

Los distintos STs se pueden clasificar según la presencia o no de dobles enlaces en la posición 5.

Esteroides. Si tienen un doble enlace en la posición 5 del segundo anillo hexagonal: colesterol, sitosterol, campesterol, estigmasterol (figura 5)

Estanoles. No tienen un doble enlace en la posición 5 del segundo anillo hexagonal: colestanol, sitostanol, campestanol, estigmastanol...

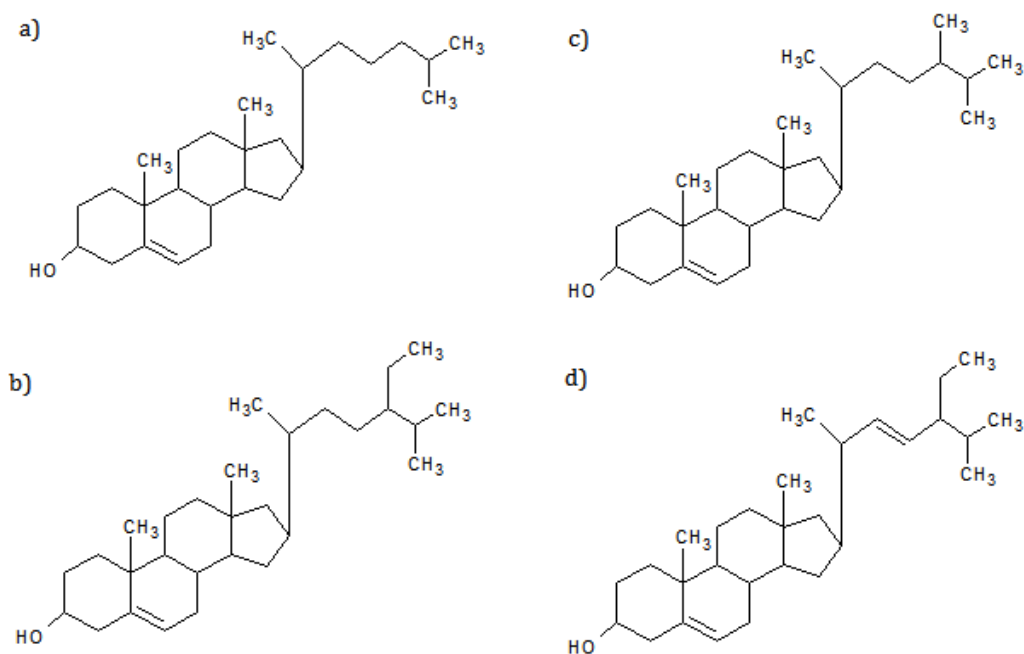


Figura 5. Moléculas de esteroides: Colesterol (a), sitosterol (b), campesterol (c) y estigmasterol (d)

a) Esteroides de origen animal.

El Cho (Figura 5a) es el ST predominante en animales, el cual se encuentra en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados. También es importante destacar las elevadas concentraciones del mismo que hay en hígado, médula espinal, páncreas y cerebro (42).

La cantidad de Cho en el organismo procede de dos vías, una vía exógena, que correspondería al Cho procedente de la dieta, y una vía endógena que correspondería al Cho sintetizado por el propio organismo, llevado a cabo principalmente en el hígado.

El Cho es un componente lipídico imprescindible para la vida animal y se encuentra vinculado a diferentes funciones biológicas del organismo humano, tiene una importante función estructural, y actúa como precursor de hormonas sexuales, corticoesteroidales, vitamina D o sales biliares (SB) (43).

Sin embargo, hoy en día el Cho es un ST bastante estudiado, no tanto por sus funciones biológicas, sino debido a la repercusión negativa que puede tener un exceso de Cho en el torrente sanguíneo. Un aumento de la cantidad de Cho en sangre puede llevar a la aparición de placas de ateroma en las venas y arterias del organismo. Estas placas de ateroma pueden ir creciendo, provocando una disminución del flujo sanguíneo del capilar en el que se encuentre, lo cual podría derivar en problemas de circulación, aparición de trombos y desarrollo de CVD, como la enfermedad arterial coronaria o los accidentes cerebro vasculares (44). Como bien es sabido, estos problemas derivados de la hipercolesterolemia presentan una elevada incidencia en la gran mayoría de países desarrollados (45), de ahí que gran parte de la investigación y terapias actuales en torno al Cho traten de buscar estrategias o mecanismos que den lugar a efectos hipocolesterolémicos para la prevención de este tipo de enfermedades.

b) Esteroles de origen vegetal

Los fitoesteroles (PS) son STs de origen vegetal con una estructura similar a la del Cho. Estos compuestos actúan como componentes estructurales de las membranas vegetales, estabilizando la bicapa de PL a la vez que sirven de intermediarios para la biosíntesis de celulosa y de numerosos productos vegetales secundarios, como los alcaloides (46).

Existen una gran cantidad de PS en la naturaleza, entre los cuales destacan como mayoritarios el β -sitosterol (Figura 5b), el campesterol (Figura 5c) y el estigmasterol (figura 5d), y sus análogos estanoles (3, 4, 46).

Se pueden encontrar PS en la naturaleza de dos maneras, libres o como compuestos complejos, es decir, esterificados a FAs, a ácido ferúlico o glicosilados. En general, cerca del 50% del total de los PS que se encuentran en los alimentos están esterificados a FAs o a ácido ferúlico, mientras que los esteroles glicosilados son un componente más minoritario. (47).

La principal función bioactiva que se ha observado que desempeñan los PS está relacionada con un efecto hipocolesterolémico. En la actualidad existen diversos estudios en relación al papel biológico que desempeñan los PS frente a la absorción del Cho (48). Se ha estudiado que los PS pueden interferir en la

absorción intestinal de Cho, habiéndose planteado distintos niveles de acción en los cuáles los PS podrían reducir la cantidad de Cho en el organismo (49).

- *Co-cristalización.* Los PS podrían co-cristalizar con el Cho que se encuentra en el medio intestinal provocando la formación de cristales mixtos, los cuáles no podrían formar parte de las estructuras micelares que se forman en el medio acuoso intestinal, y que son necesarias para la absorción del colesterol, y precipitarían (49).

- *Interacción con enzimas.* Se ha observado que los PS podrían inhibir la acción de la enzima colesterol esterasa pancreática, enzima responsable de la hidrólisis de ésteres de esterol, bloqueando a la enzima y disminuyendo su actividad (49).

- *Competición con solubilización micelar.* Los PS podrían competir con el Cho a nivel de su inclusión dentro de las estructuras micelares. Se ha observado que los PS podrían tener una mayor facilidad para incluirse dentro de las estructuras micelares, lo que provocaría una disminución de la bioaccesibilidad del Cho a nivel de su absorción intestinal (49).

- *Competición en el transporte intra-celular:* Por otro lado, se ha observado que los PS podrían competir con el Cho también a nivel de su transporte intra-celular, reduciendo el nivel de acción de los transportadores del Cho en las células intestinales (48, 49)

Esta propiedad biológica de los PS frente al metabolismo y absorción del Cho los hace una familia lipídica de mucho interés científico en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Así, en la actualidad, se pueden encontrar diversos productos comerciales enriquecidos con PS, con la finalidad de ayudar a reducir el nivel de Cho en sangre. Algunos de estos productos los podemos encontrar en alimentos de gran consumo, como son algunas margarinas enriquecidas en PS o algunos derivados lácteos.

Por otro lado, se ha descrito en otros estudios de la bibliografía que los PS se encuentran relacionados con otras funciones bioactivas de especial interés, como pueden ser propiedades anti-inflamatorias, antipiréticas y anti-diabéticas, y la potencial capacidad de reducir el riesgo de padecer CVD (50, 51). Aún quedan por llevar a cabo muchos estudios para conocer con mayor precisión todos los efectos bioactivos que pueden tener sobre el organismo los PS, aunque ya se están llevando a cabo muchos de ellos en relación al efecto de los PS sobre células cancerígenas (52, 53).

1.1.2.4. Fosfolípidos

Los PLs son un tipo de lípidos anfipáticos, compuestos mayoritariamente por una molécula de glicerol esterificada con dos FAs y un grupo fosfato (figura 6 y 7). El grupo fosfato se encuentra a su vez esterificado frecuentemente con un aminoalcohol, lo cuál confiere al conjunto de la estructura una determinada polaridad. Esta región del PL se denomina la “cabeza polar”, mientras que los dos FAs que se encuentran esterificados a la estructura formarán las “colas” hidrófobas del PL. Por esta conformación estructural los PLs son fuertes moléculas anfipáticas (54), que contienen frecuentemente cargas positivas y negativas, y que son constituyentes esenciales de las membranas formando parte de la bicapa lipídica de las células (43, 54).

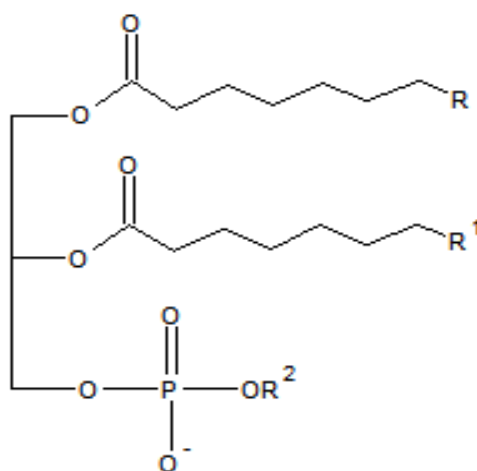


Figura 6. Molécula de Fosfolípido

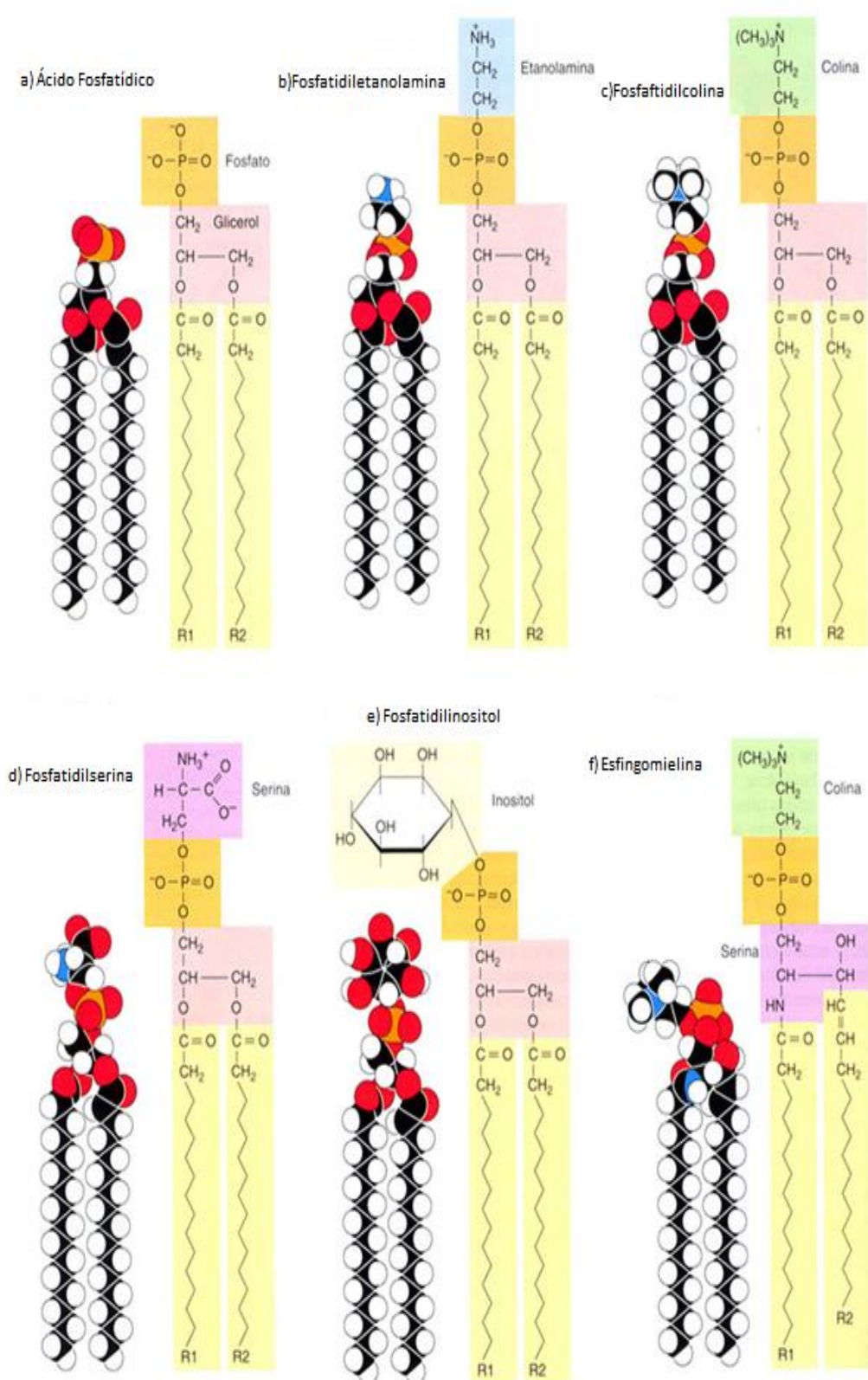


Figura 7. Estructuras moleculares de algunos fosfolípidos. a) Ácido fosfatídico, b) Fosfatidiletanolamina, c) Fosfatidilcolina, d) Fosfatidilserina, e) Fosfatidilinositol y f) Esfingomielina (55).

Las principales funciones biológicas que desempeñan los PLs en el organismo están relacionadas con su papel estructural de membrana y su papel de señalización celular. Por otro lado, se ha descrito que forman parte de la secreción biliar, desempeñando un importante papel en la formación de micelas mixtas y estructuras micelares, necesarias para transportar los productos lipídicos liberados de la hidrólisis intestinal a los enterocitos. Se ha visto que también actúan como surfactante pulmonar y en la activación de enzimas (56).

Por otro lado, las principales funciones bioactivas descritas para los PLs están relacionadas con su papel frente a la hipercolesterolemia, aterosclerosis, CDV, inflamación e inmunidad, desórdenes del hígado, desarrollo neurológico y otras enfermedades crónicas (57).

1.1.3. Lípidos como vehículos de compuestos bioactivos

Es importante señalar que algunas de las bioactividades anteriormente mencionadas no siempre se aprovechan eficientemente, debido a determinadas limitaciones que presentan algunos lípidos bioactivos. Por un lado, su carácter hidrofóbico dificulta su inclusión en determinadas matrices alimentarias cuando se trata de enriquecer o adicionar estos lípidos con el fin de ofrecer alimentos ricos en los mismos que permitan aprovechar sus propiedades bioactivas. Como ejemplo, esta problemática existió inicialmente cuando se comenzaron a plantear productos enriquecidos en PS como forma de producción de alimentos funcionales con actividad hipocolesterolémica (58).

Por otro lado, otros lípidos bioactivos han mostrado el problema de vehiculización por el sistema circulatorio hasta llegar al punto de acción, lo que puede llevar a una pérdida de funcionalidad del lípido bioactivo, al no llegar a alcanzarse concentraciones bioactivas en el torrente sanguíneo para ejercer su función (59). El ácido butírico, mencionado anteriormente por su gran interés bioactivo, sería un ejemplo de FA con esta problemática, habiéndose mostrado que

tiene un tiempo de vida media en plasma muy limitado, no llegándose a alcanzar un efecto bioactivo significativo en los tejidos diana (60).

Estas limitaciones han llevado al planteamiento en los últimos años del desarrollo de sistemas de vehiculización, tanto físicos como químicos, para la introducción eficiente de lípidos bioactivos en determinadas matrices alimentarias y para la vehiculización de determinados lípidos bioactivos a través de la sangre, permitiéndoles alcanzar concentraciones bioactivas para poder actuar sobre su diana de acción. Las formas de vehiculización físicas se podrían definir como aquellas que transportaran el lípido bioactivo mediante la formación de emulsiones lipídicas, micronización, nanopartículas o dispersiones sólidas, que vehiculizarán al lípido bioactivo de interés a través de estas disposiciones físicas. Las formas de vehiculización químicas, por otro lado, serían aquellas que transportaran el lípido bioactivo formando parte de su estructura química, es decir, mediante la inclusión del lípido bioactivo en la propia molécula a través de reacciones químicas o enzimáticas (7, 59).

En este sentido, en la bibliografía se encuentran descritos diversos vehículos lipídicos de determinados lípidos de interés, tanto en formas de vehiculización físicas como químicas. En este apartado del capítulo se van a mencionar algunos ejemplos de trabajos de la bibliografía de vehículos lipídicos sintetizados química o enzimáticamente, dado que es la forma de vehiculización que resulta más relevante teniendo en cuenta la temática de la presente Tesis.

Como ejemplo de vehículos de ácido butírico, Clarke et al (61) esterificaron una molécula de glicerol con tres ácidos butíricos (tributirina) que permitiese alcanzar concentraciones bioactivas de este FA. En cuanto a la problemática de PS, se plantearon como vehículos lipídicos la producción de ésteres de PS, como el descrito por Demonty et al (62), dónde se describe la obtención de un PS esterificado con FA de aceite de pescado, combinándose así además en la misma molécula los efectos beneficiosos de los PS y de los PUFAs del aceite de pescado.

También se pueden encontrar ejemplos de vehículos de lípidos bioactivos en forma de PL, como el descrito por Miyamoto et al (63), cuyos autores han

desarrollado un éster de fosfato con vitamina E, con el cual se pretendió mejorar la actividad antioxidante de esta vitamina gracias a la forma de vehiculización.

En este sentido, el grupo de investigación de Ingredientes Alimentarios Funcionales de la Universidad Autónoma de Madrid (IAF-UAM) lleva varios años trabajando en el desarrollo y producción de vehículos de lípidos bioactivos, así como distintas modificaciones químicas y/o enzimáticas de estos que permitan aprovechar más eficientemente la bioactividad de los mismos.

Uno de los vehículos lipídicos producidos ha sido un alquilglicerol diesterificado con dos ácidos butíricos (D-SCAKG) (64). Este vehículo lipídico podría presentar dos posibles características de interés, por un lado sería un potencial vehículo del ácido butírico, y por otro lado, aportaría a la molécula la propia bioactividad de los alquilglicerolos comentada con anterioridad.

Por otro lado, el grupo IAF-UAM llevó a cabo el desarrollo y producción de un PS esterificado con CLA (PS-CLA) (65). En el mismo sentido que el producto D-SCAKG, este vehículo lipídico por un lado sería una manera efectiva de vehiculizar el ácido graso bioactivo CLA y, por otro lado, podría presentar las propiedades hipocolesterolémicas descritas para los PS (65).

Además del interés de formas lipídicas como vehículos de otros lípidos bioactivos, resulta relevante señalar que los lípidos pueden utilizarse igualmente como vehículos de otros compuestos bioactivos, no necesariamente lipídicos. Sería el caso de la vehiculización mediante lípidos de distintas estructuras bioactivas que presentan las mismas problemáticas anteriormente descritas (limitada bioaccesibilidad, vida media en plasma reducida, modificación de su bioactividad durante el proceso digestivo o dificultad de inclusión en matrices alimentarias), las cuales limitan el aprovechamiento efectivo de su bioactividad. Sería el caso de muchos compuestos fenólicos o diversas formas de vitaminas.

Como ejemplo de un TG esterificado con vitaminas se describe el trabajo de Naalsund et al (66), cuyos autores esterificaron ácido carotenoico, FA con selenio (Seleno) y vitamina E a una molécula de glicerol, dando lugar a lo que

denominaron “glicérido tri-antioxidante”. Otro trabajo en el cual se describe un vehículo lipídico de un compuesto bioactivo es el llevado a cabo por Reddy et al (67), donde se ha sintetizado un TG con 2 ácidos ferúlicos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3. Se han descrito trabajos en los que se han esterificado PS con vitaminas, como es el ejemplo del trabajo de Kutney et al (68), donde se describe la obtención de un PS esterificado con ácido ascórbico (vitamina C), que permitirá el transporte de la vitamina C evitando su degradación. Un ejemplo de vehículo lipídico en el cual se utilizan los alquilglicerol como vehículo de compuestos fenólicos es el trabajo de Madrona et al (69), cuyos autores sintetizaron un alquilglicerol esterificado con hidroxitirosol (HT). El HT es un compuesto fenólico de especial interés en los últimos años debido a que ha demostrado tener cierta actividad antioxidante tanto biológica como tecnológica, junto a otras bioactividades, relacionada con efectos antiaterogénicos, anti-inflamatorios, antimicrobianos, antitumorales, efectos de regulación del envejecimiento y efectos frente a la agregación plaquetaria (70, 71).

En este sentido, otro de los productos desarrollado por el grupo de investigación IAF-UAM pertenece al grupo de los PLs y se trata de una molécula de fosfatidilcolina que lleva esterificada una molécula de HT en la cabeza polar (72, 73). Este nuevo vehículo lipídico, denominado fosfatidilhidroxitirosol (PHT), presentaría características de especial interés en relación, por un lado, al transporte del HT, y por otro lado, aportando a la molécula las características bioactivas de los PLs, descritas con anterioridad.

1.2. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS

1.2.1. ASPECTOS GENERALES

Es importante señalar que cuando se desarrollan nuevos lípidos bioactivos y/o vehículos lipídicos como los comentados en el apartado anterior, como parte de la evaluación de su potencial bioactivo o funcional, es necesario conocer, entre otros aspectos, su comportamiento durante el proceso de digestión; saber si serán reconocidos por las enzimas digestivas, si sus productos de hidrólisis serán

En los seres vivos, la hidrólisis de los lípidos comienza en el estómago mediante la acción de la lipasa gástrica, enzima lipolítica secretada por las células principales de la mucosa gástrica (75-78), donde se ha observado que se pueden

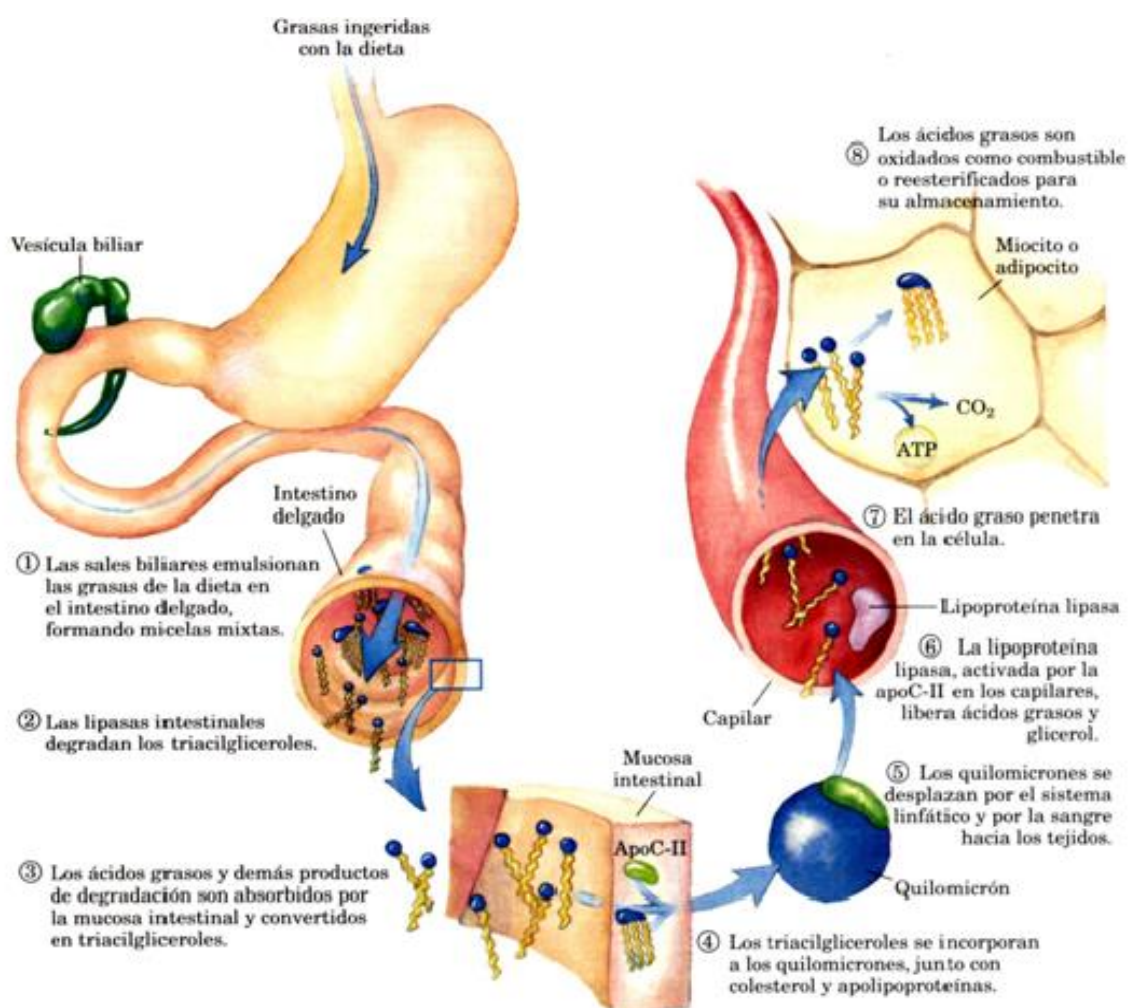


Figura 8. Esquema general del proceso de digestión y absorción de lípidos (79)

alcanzar niveles de hidrólisis entorno al 10-30 % de los componentes lipídicos.

A este mismo nivel, las fuerzas de cizallamiento producidas por las contracciones de los músculos del estómago y por el vaciado gástrico del mismo, junto a la ionización parcial de los FFA, ayudarán a la formación de una emulsión con los diferentes productos que se han ido liberando de la hidrólisis gástrica, principalmente TG sin digerir, con pequeñas proporciones de DG, MG y FA liberados de la acción de la lipasa gástrica (Figura 9) (80).

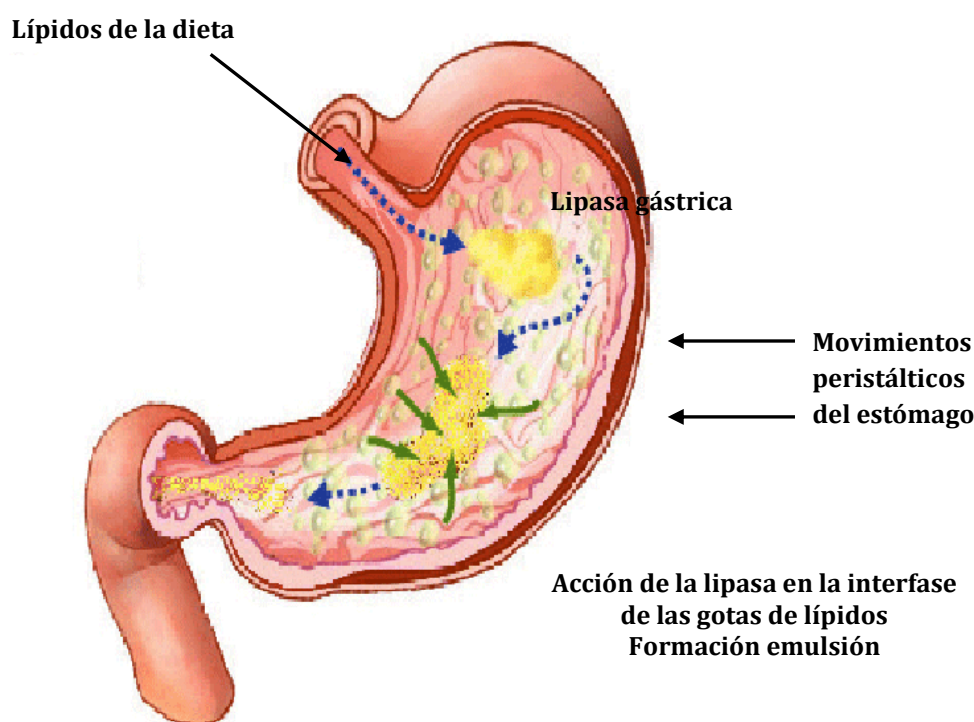


Figura 9. Esquema de la digestión de lípidos a nivel gástrico (81)

Esta emulsión pasará al duodeno, lo que estimula la secreción biliar producida por el hígado y que es secretada a través del conducto biliar. Dicha secreción biliar estará compuesta fundamentalmente por SB, PL y Cho. A su vez se estimula la secreción del jugo pancreático al lumen de la primera fracción del intestino delgado. Esta secreción contiene todas las diferentes enzimas digestivas, incluidas las lipolíticas, como son las enzimas lipasa pancreática, fosfolípasa o esteroesterasa (80). Gracias a la acción de estas enzimas, a nivel intestinal es

dónde tiene lugar la mayor parte de la hidrólisis de los componentes lipídicos, alcanzándose porcentajes de hidrólisis entre el 50-90% dependiendo de la naturaleza del compuesto lipídico.

La secreción de compuestos con propiedades emulsionantes como las SB y PL, alterará drásticamente la emulsión lipídica inicial que se había formado, llevando a la formación de una compleja estructura coloidal, la cual quedará formada por una mezcla de micelas en forma de disco y vesículas líquidas cristalinas y unilamelares (78, 79). En la interfase de estas formas dispersas de lípidos será dónde lleven a cabo su acción las diversas enzimas lipolíticas que participan en la digestión de los compuestos lipídicos, liberando así los productos correspondientes de hidrólisis.

1.2.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DURANTE LA DIGESTIÓN

1.2.2.1. Digestión de acilgliceroles

La hidrólisis de los acilgliceroles depende principalmente de la acción de la lipasa pancreática, la cual es una enzima *sn*-1,3 específica. Esta enzima actúa en la interfase formada entre el medio acuoso y los lípidos dispersos en el mismo, hidrolizando los TG en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, y liberando en primer lugar FFA y 1,2-DG. El 1,2-DG será igualmente reconocido por la lipasa pancreática, siendo hidrolizado a FFA y 2-MG, siendo estos por tanto los productos finales y mayoritarios de la digestión de los TG (figura 10) (78, 82). Adicionalmente, el ácido graso esterificado del 2-MG puede sufrir un proceso parcial de acilmigración hacia la posición *sn*-1 del glicerol, dando lugar a la aparición de cierto nivel de 1-MG, el cuál puede ser hidrolizado por la lipasa pancreática, liberando FFA y glicerol (76, 83).

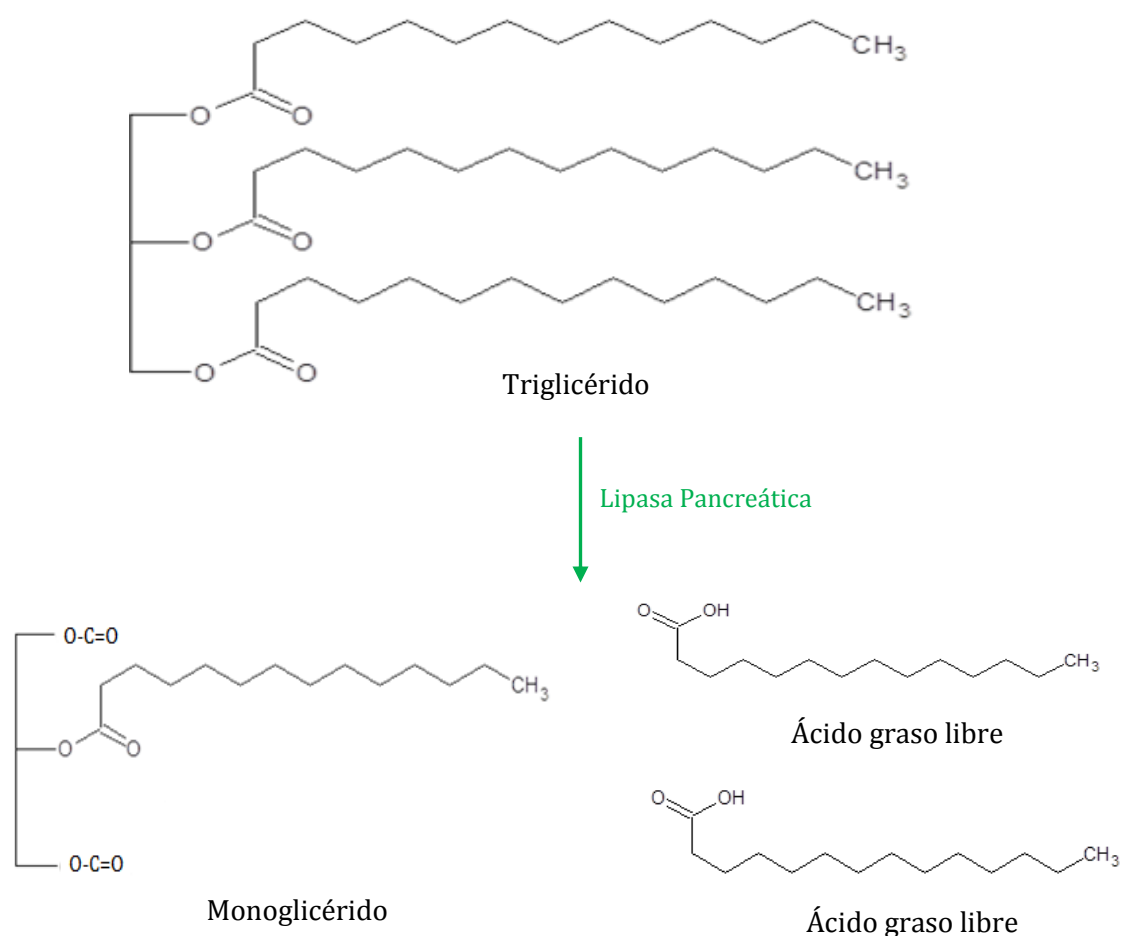


Figura 10. Reacción de hidrólisis de los TG por la lipasa pancreática durante la digestión intestinal

En el caso de la hidrólisis de glicéridos parciales como DG o MG, esta es muy similar a la de los TG. Los DG, tanto las formas 1,2-DG como 1,3-DG, serán reconocidos por la lipasa pancreática e hidrolizados a 2-MG y FFA, o a 1-MG y FFA, respectivamente. Parte de los MG liberados serán absorbidos por los enterocitos (fundamentalmente 2-MG), mientras que otra parte pueden continuar hidrolizándose a FFA y glicerol (fundamentalmente 1-MG) (78, 82). Igualmente en el caso de los glicéridos parciales puede tener lugar cierto grado de acilmigración de los FA de la posición *sn*-2 a *sn*-1(3).

1.2.2.2. Digestión de ésteres de esterol

La hidrólisis de los ésteres de esterol es catalizada por la enzima colesterol esterasa, una enzima secretada junto a la lipasa pancreática en la secreción del

jugo pancreático. La colesterol esterasa hidroliza el enlace éster entre los esteroides y el FA esterificado, liberando como productos finales de la reacción FFA y esteroide libre (figura 11) (84). Es importante señalar que el proceso de digestión sucede así tanto para los ésteres de colesterol como para los ésteres de PS. Además, se ha descrito en la bibliografía que la colesterol esterasa no sólo hidroliza los ésteres de esteroide, sino que es capaz de reconocer e hidrolizar otros componentes lipídicos, como los glicéridos (84).

Esta enzima, a diferencia de la lipasa pancreática, necesita la presencia de las SB para llevar a cabo la reacción de hidrólisis de los sustratos. Esto es debido a que la presencia de las SB en el lumen intestinal mantiene bloqueada la acción de esterificación que también posee la enzima colesterol esterasa, favoreciendo la reacción de hidrólisis de los ésteres de esteroide, y además, protegiendo a la enzima de la digestión proteolítica que sucede a nivel del intestino delgado (85).

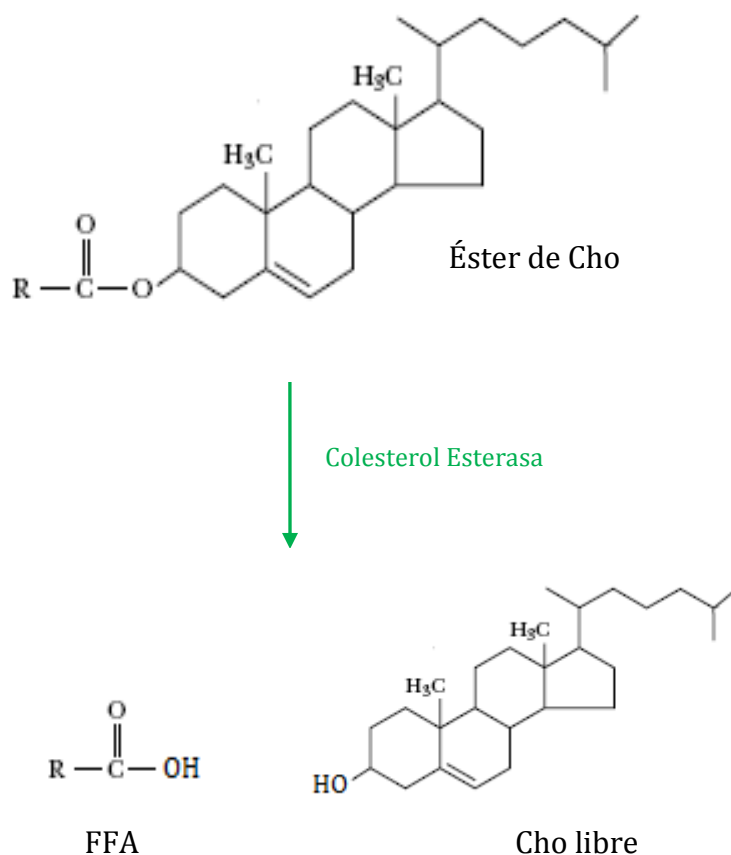


Figura 11. Reacción de hidrólisis de éster de colesterol por la enzima colesterol esterasa durante la digestión intestinal

1.2.2.3. Digestión de fosfolípidos

La hidrólisis de los PLs es llevada a cabo por un grupo de enzimas denominadas fosfolipasas. Las fosfolipasas son liberadas junto a todas las enzimas mencionadas en los apartados anteriores, a través del jugo pancreático al lumen intestinal. En concreto, en el jugo pancreático se libera fundamentalmente fosfolipasa A2 (PLA₂), la enzima encargada de llevar a cabo la digestión de los PLs, catalizando la reacción de hidrólisis del ácido graso esterificado en la posición *sn*-2, y liberando FFA y lisofosfolípidos (liso-PL) (figura 12) (86).

La PLA₂ se encuentra en el jugo pancreático en forma de zimógeno o proenzima, es decir, como un precursor enzimático inactivo. Para activar esta enzima es necesaria la tripsina, una enzima proteolítica que hidroliza un enlace peptídico de la proenzima PLA₂ para poder activarla. Además, es necesaria la presencia del ión calcio como co-factor, debido a que es capaz de polarizar el oxígeno del carbonilo *sn*-2 para activar la enzima. Finalmente, la eficiencia en la actividad de la PLA₂ depende de la relación PL/SB en las micelas que se formen, siendo la enzima más efectiva con concentraciones de PL superiores con respecto a las de SB (87).

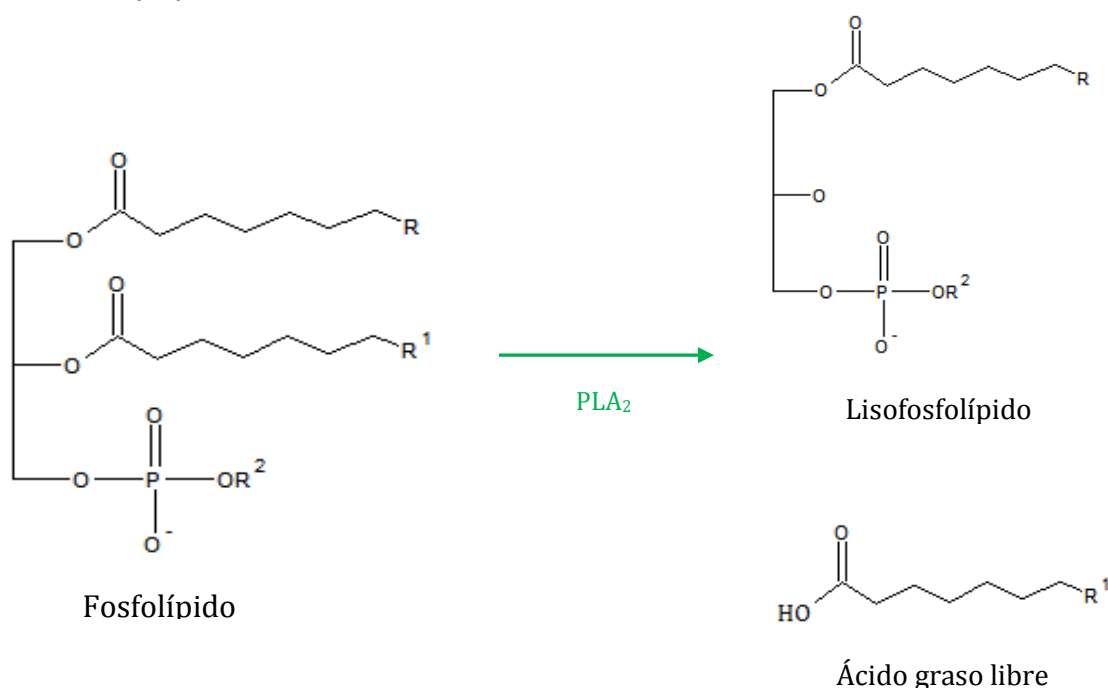


Figura 12. Reacción de hidrólisis de los PL por la enzima PLA₂ durante la digestión intestinal

1.2.3. ABSORCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DIGESTIÓN

Después de la hidrólisis enzimática de las distintas formas lipídicas, los productos liberados se van dispersando en el medio acuoso gracias a su inclusión en nuevas micelas, micelas mixtas y vesículas formadas con las SB y los PLs (88, 89) (figura 13).

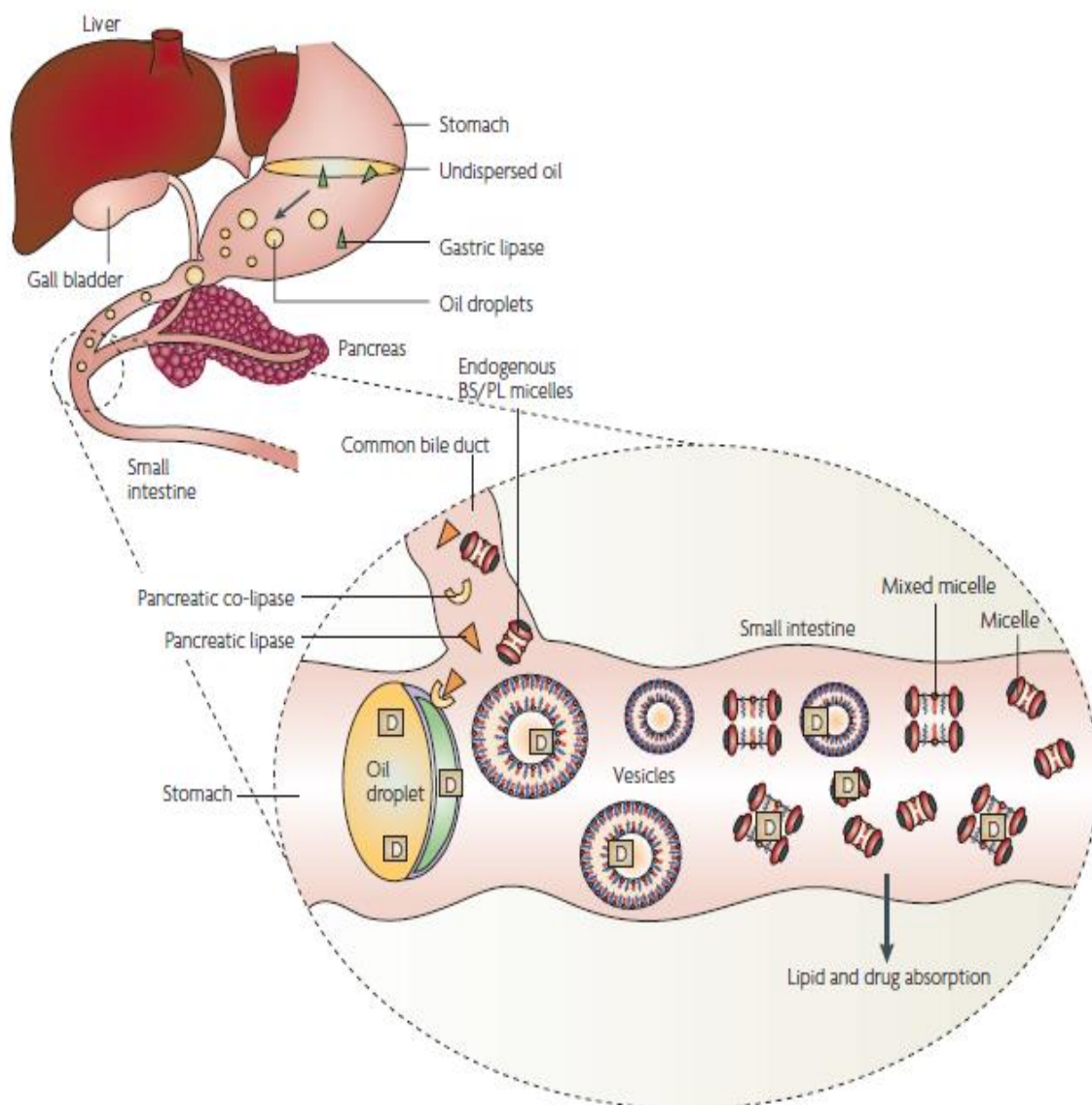


Figura 13. Esquema general de la digestión lipídica intestinal (89)

Debido al carácter hidrofóbico de los lípidos, es fundamental que se formen estas distintas formas de dispersión para que se produzca una correcta distribución de los productos lipídicos en el medio acuoso intestinal y facilitar así su acceso a las células del epitelio intestinal, donde tendrá lugar la absorción de los productos liberados durante la hidrólisis (89).

No obstante, no todos los productos liberados durante la hidrólisis de los lípidos necesitan incluirse dentro de estas estructuras micelares para poder ser transportados por el medio acuoso y llegar a las células epiteliales del intestino. Un ejemplo de ello son los SCFAs, los cuales no necesitan ser incluidos en las micelas, sino que se encuentran de forma libre en el medio (figura 14) (90).

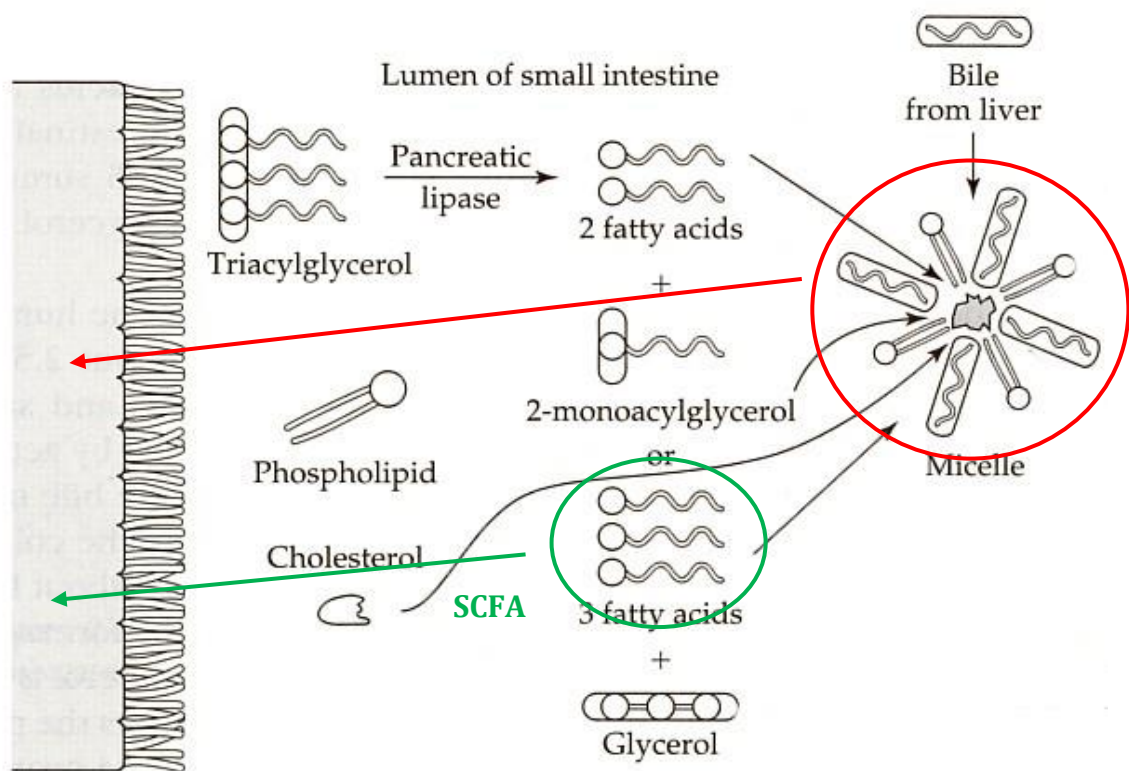


Figura 14. Esquema general de la absorción de los productos de la hidrólisis a nivel intestinal (90)

1.3. MODELOS DE DIGESTIÓN *IN VITRO*

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los aspectos importantes a conocer cuando se quiere evaluar un potencial lípido bioactivo es saber cómo será su digestión. La mejor manera de llevar a cabo esta evaluación sería a través de estudios de digestión *in vivo*, mediante la ingesta directa del compuesto de interés, bien utilizando modelos animales *in vivo*, o bien mediante estudios de intervención en humanos, que darían lugar a resultados fisiológicos y reales. Sin embargo, los estudios de digestión *in vivo* tienen algunas limitaciones que hacen difícil su uso en determinados estudios, como son su elevado coste, la gran variabilidad de resultados que pueden proporcionar, la necesidad de utilizar una elevada cantidad de tiempo para llevarlos a cabo y el factor ético que los envuelve. Todas estas limitaciones han provocado que se busquen y desarrollen nuevas alternativas de trabajo, con las cuáles poder conocer de un modo más rápido y sencillo los aspectos relacionados con el proceso de digestión de determinados productos de interés. Esta situación ha llevado en los últimos años al desarrollo de modelos de simulación del proceso de digestión en condiciones *in vitro*, los cuales permiten llevar a cabo una evaluación preliminar de cómo será el comportamiento digestivo de determinados compuestos bioactivos de interés, como pueden ser nuevos compuestos lipídicos (91).

Los modelos de digestión *in vitro* tratan de simular las condiciones fisiológicas que tienen lugar en el tracto gastrointestinal durante el proceso de digestión, con la intención de reproducir de una manera lo más parecida a la realidad el proceso de digestión, y así poder evaluar el potencial grado de hidrólisis y la potencial bioaccesibilidad (91).

Sin embargo, es importante señalar que en lo que respecta a los modelos de digestión *in vitro*, no existe un protocolo estandarizado, sino que existe una amplia variabilidad de modelos descritos en la bibliografía, donde las condiciones utilizadas del proceso son muy variables, tal y como se detallará más adelante (92, 93). Esta discrepancia en las condiciones aplicadas en los modelos de digestión afecta igualmente a los modelos que se han podido encontrar descritos en la bibliografía para los casos particulares en los que se simula la digestión de formas

lipídicas. Además, en el caso concreto de los lípidos, la mayoría de los modelos *in vitro* descritos en la bibliografía, han sido aplicados para la molécula lipídica más habitual, los TG, no habiéndose descrito, o siendo muy escasos, los modelos de digestión *in vitro* específicos de otras moléculas lipídicas, como los STs y los PLs (93).

1.3.1. TIPOS DE MODELOS DE DIGESTIÓN *IN VITRO*

Los modelos de digestión *in vitro* se pueden clasificar de varias maneras, atendiendo a diferentes criterios (90, 91).

- *Según la capacidad de simulación de fenómenos físicos.* Esta clasificación atiende únicamente a si los modelos reproducen o no los fenómenos físicos que tienen lugar durante la digestión, tales como el peristaltismo, los cambios de viscosidad, la reducción del tamaño de partícula o la difusión de los nutrientes.
 - ✓ *Modelos estáticos.* Son aquellos modelos que no reproducen los fenómenos físicos. Estos modelos de digestión *in vitro* son los más habituales que se pueden encontrar, tanto en la simulación de la digestión de lípidos (94, 95), como de gran diversidad de compuestos de interés en general, con fines muy diferentes.
 - ✓ *Modelos dinámicos.* Son aquellos modelos que sí tratan de reproducir parte de los fenómenos físicos que suceden durante la digestión fisiológica. Estos sistemas utilizan herramientas y equipos más complejos para llevar a cabo la simulación de fenómenos como la absorción de los productos a medida que se liberan, o un peristaltismo más real. Sin embargo, dado que las tecnologías utilizadas son más costosas, su uso está menos extendido. En la bibliografía se han descrito algunos ejemplos de digestión de lípidos con modelos dinámicos (96, 97).
- *Según el tipo de transformación del compuesto.* Esta clasificación se centra en el tipo de reacción que tiene lugar en la simulación *in vitro*, la cual

vendrá determinada por el tramo del tracto digestivo en el cual tiene lugar la digestión

- ✓ *Modelos hidrolíticos.* Son modelos basados en las reacciones enzimáticas de hidrólisis, dentro de los cuales se encuentran los modelos de digestión oral, los modelos de digestión gástrica y los modelos de digestión intestinal. Se tratan de los modelos más habituales en la simulación de la digestión de lípidos en general, destacando especialmente los modelos de digestión intestinal que simulan los tramos del intestino delgado (97, 98).
- ✓ *Modelos fermentativos.* Son modelos basados en la simulación de reacciones de fermentación por la flora bacteriana colónica, de ahí que se denominen también modelos colónicos. Teniendo en cuenta esta funcionalidad, no es habitual encontrar en la bibliografía modelos digestivos de este tipo para lípidos en general.
- *Según las etapas de simulación.* Esta clasificación se basa en el número de etapas de digestión que tratan de simular.
 - ✓ *Mono-compartmentales.* Son modelos que sólo llevan a cabo la simulación de una de las etapas del proceso de digestión (oral, gástrica, intestinal o colónica), con lo cual se realiza en un sólo compartimento. La mayoría de los modelos de digestión *in vitro* de lípidos son mono-compartmentales (99).
 - ✓ *Poli-compartmentales.* Son modelos donde se utilizan varios compartimentos en los que se simulará en cada uno de ellos las distintas etapas del proceso de digestión (100).

Tal y como se ha ido mencionando, en la bibliografía se han descrito modelos de digestión de compuestos lipídicos de los diferentes tipos de modelos mencionados con anterioridad. Sin embargo, los modelos de digestión intestinal *in vitro* que se pueden encontrar más habitualmente en la bibliografía para lípidos en general son modelos de tipo hidrolíticos, estáticos, y mono-compartmentales, que se centran en simular la digestión del lípido de estudio concretamente en el tramo del tracto digestivo donde tiene lugar su hidrólisis y absorción mayoritaria, es

decir, en el caso de los lípidos habitualmente se simulan las condiciones de digestión de los primeros tramos del intestino delgado.

1.3.2. PARÁMETROS DE LOS MODELOS DE DIGESTIÓN *IN VITRO*

Para desarrollar un modelo de digestión *in vitro* es necesario tener en cuenta una serie de parámetros, que van a jugar un papel fundamental en la obtención de un modelo que proporcione resultados similares a una situación fisiológica en condiciones *in vivo*. Por este motivo, en el desarrollo de un modelo de digestión *in vitro* se hace necesario tener información acerca de cómo es la digestión *in vivo* de los compuestos de estudio, para asegurar que los resultados *in vitro* coinciden con lo que se ha estudiado a nivel fisiológico. Estos parámetros, en función del tramo digestivo que se pretenda simular en el modelo *in vitro* y de la matriz lipídica que se quiera estudiar, se modificarán de diferente manera. A continuación, se enumeran los principales parámetros a considerar en la simulación de un proceso de digestión intestinal *in vitro* para el caso particular de compuestos lipídicos.

Relación enzima/sustrato.

Se trata de uno de los parámetros fundamentales en los modelos de digestión hidrolíticos. Esta relación deberá ser lo más parecida a lo que se haya visto en estudios previos *in vivo*, tratando de guardar un valor lo más fisiológico posible, y que garantice a su vez resultados de hidrólisis comparables a una situación real (77). Es de especial interés tener en cuenta que en muchos estudios *in vivo* se han indicado proporciones de enzima/sustrato muy variables a nivel fisiológico durante el proceso de digestión, tanto de enzima, como de sustrato, como de ambos, lo que podría dificultar la elección de la cantidad de enzima necesaria para simular una digestión fisiológica (77). Como ejemplo, los distintos niveles de enzima y sustrato que se han descrito en la bibliografía se ilustran más adelante en la tabla 1.

En cuanto al sustrato lipídico, resulta relevante tener en cuenta la cantidad de lípido que se va a digerir con el modelo, tratando siempre de simular cantidades

que fueran extrapolables a las cantidades habituales de consumo del mismo, para conseguir un resultado representativo de lo que sucedería a nivel de ingesta real.

Relación PL/SB.

Como se señaló anteriormente en el apartado 1.2.4 en relación a la absorción de los lípidos después de su hidrólisis, la relación PL/SB muestra una gran relevancia en el nivel de hidrólisis del sustrato de estudio (100), debido a la importancia en la formación de estructuras micelares con una interfase idónea para que actúe la enzima encargada de llevar a cabo la hidrólisis del sustrato de estudio (101). Por tanto, es necesario tener en cuenta este parámetro a la hora de tratar de simular una formación de las micelas fisiológica, pues se ha observado en diversos estudios que una relación inapropiada de ambos compuestos puede dar lugar a la inhibición de la enzima encargada de llevar a cabo la reacción hidrolítica (101, 102). Los distintos niveles que se han descrito en la bibliografía de SB y PL se ilustran más adelante en la tabla1.

Tiempo de digestión.

Vendrá determinado por el tramo del tracto gastrointestinal que se pretenda simular. Lo que principalmente se encuentra en la bibliografía en relación al tiempo de digestión es 5-60 segundos la digestión oral, de 30 min-4 horas la digestión gástrica, de 1-2 horas la digestión intestinal y de 12-24 horas la digestión colónica (101). Por tanto, es necesario mantener en la digestión *in vitro* el tiempo requerido para alcanzar valores de hidrólisis comparables con los observados *in vivo*. Para cada compuesto de estudio se prestará mayor atención a un tramo concreto u a otro, destacando que en el caso de los lípidos, su digestión tiene lugar principalmente en los primeros tramos del intestino delgado (103).

pH del medio de digestión.

Se trata de un parámetro muy variable según el tramo del tracto gastrointestinal que se pretenda estudiar. El pH varía a lo largo de todo el tracto

digestivo en un rango de valores muy diferentes, dónde se destaca un pH de 5 a 7 en la digestión oral, un pH ácido de 1 a 3 en la digestión gástrica, un pH de 6 a 7,5 en la digestión intestinal y un pH de 5 a 7 en la digestión colónica (104). El valor de pH para cada uno de los tramos de la digestión es de especial importancia, ya que en función del pH del medio de digestión las enzimas llevarán o no a cabo su función hidrolítica. Además, es interesante intentar mantener el pH estable dentro de los rangos comentados con anterioridad durante la digestión *in vitro*, para asegurar que la enzima se encuentra en condiciones óptimas de acción, y simular así igualmente la estabilidad del pH que se da en el medio intestinal, gracias al efecto tamponante que tienen distintas sales que son secretadas a la luz intestinal. En el caso concreto de la digestión *in vitro* de los componentes lipídicos, los modelos de digestión tratan de mantener el pH en valores entre 6 y 7,5 (tabla 1); que como se acaba de comentar, serían los valores de pH del intestino delgado, tramo dónde tiene lugar principalmente la digestión de los lípidos.

Composición mineral de los fluidos digestivos.

Dentro de la composición en minerales de los fluidos digestivos es importante resaltar el papel del calcio en el grado y velocidad de hidrólisis de la digestión (105). Existen estudios en los que se ha descrito el efecto del calcio como co-factor sobre la actividad de la lipasa pancreática o la PLA₂, así como su efecto en la eliminación de los FFA que se acumulan en la interfase de las gotas lipídicas, los cuales impedirían la acción de la lipasa pancreática sobre las gotas lipídicas (105). Por otro lado, un exceso de cantidad de ión calcio en el medio de digestión podría llevar a una disminución de la digestibilidad de los lípidos, debido a que favorece la floculación de las gotas lipídicas. También se ha descrito en la bibliografía como un efecto fisiológico el hecho de que reduzca la biodisponibilidad de determinados FFA, debido a la formación de jabones insolubles entre el calcio y FFA como son especialmente los LCSFA (105). Por todos estos motivos es de especial interés mantener los niveles de calcio en los modelos de digestión *in vitro* en un rango fisiológico. En la tabla 1 se muestran los distintos niveles que se utilizan de Ca en modelos de digestión *in vitro*.

Simulación de los movimientos peristálticos.

La importancia de este parámetro radica en la ruptura que provoca de las estructuras iniciales de los alimentos para facilitar la posibilidad de acción de las enzimas digestivas, así como en el mezclado de los alimentos ingeridos con los fluidos digestivos, lo que facilitara el contacto entre los sustratos que se pretenden digerir y las enzimas responsables de esta hidrólisis. Por tanto, la simulación de los movimientos mecánicos del tracto gastrointestinal favorece que se produzcan las reacciones de hidrólisis (106).

Aún teniendo en cuenta todos estos parámetros que se han de considerar en un modelo de digestión *in vitro*, los ejemplos de la tabla 1 ilustran la diversidad tan elevada que existe de diferentes condiciones de digestión *in vitro* que se han aplicado para el estudio de formas lipídicas en la bibliografía. Esta falta de uniformidad en las condiciones supone una dificultad a la hora de poder aplicar los modelos a otros compuestos lipídicos diferentes, así como a la hora de poder comparar resultados entre estudios, dado que la propia metodología conduciría a resultados diferentes. A su vez, algunas de estas condiciones *in vitro* mostradas, incluso se llegan a alejar de condiciones *in vivo*, no siendo por tanto representativas de un situación real.

Por otro lado, es habitual que en muchos modelos *in vitro* descritos en la bibliografía no se realice una evaluación o comprobación previa del modelo en cuanto que sea capaz de reproducir un resultado fisiológico. Aún alegando que se utilicen condiciones y parámetros similares a los fisiológicos, la comprobación de que efectivamente dichas condiciones llevan a un resultado fisiológico debería ser imprescindible, especialmente cuando se trata de aplicar a nuevas moléculas desconocidas, como podrían ser lípidos bioactivos de interés.

Muestra	Enzima	Lecitina/SB	Tampón	Ref
50–250 mg TG	1000 TBU/ml Fuente: pancreatina (83USP, specifications, Sigma)	5–20 mM NaTDC: 1.25–5 mM lecitina	50 mM Tris–maleato, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂	(107)
450 µl TG emulsionado con goma arábica	24 TBU/ml Fuente: pancreatina (42,500 FIP U/ g Biochemie)	8 mM NaTDC	2 mM Tris–maleate, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl ₂	(10)
7.5 mM Triolean emulsionado con lecitina	20 mg Lipasa Pancreática, 20 mg co-lipasa /15 ml Fuente: purificada de glándulas de páncreas humanas	10 mM NaTDC:NaTC (1:1)	1 mM Tris–maleate 150 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂	(107)
5 ml TG emulsionado con lecitina 30%	10 µb mg Lipasa Pancreática, 10 mg pro-colipasa /15 ml Fuente: purificado de jugo pancreático humano	8 mM (29.8% GC, 24.5% GCDC, 11.9% GDC, 12.6% TC, 13.6% TCDC, 7.6% TDC)	30 mM serum bovino albumina que contiene 150 mM NaCl, 6 mM CaCl ₂	(108)
500 ml Aceite de Oliva emulsionado con goma arábica	1–8 TBU/ml Fuente: purificado de jugo pancreático humano	6 mM NaTDC, NaTC or NaCDC	2 mM Tris–maleate, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl ₂	(109)
0–5% (w/v) emulsionado con un 10% de lecitina	840–1400 TBU/5 ml Fuente: preparado de lipase pancreatica tipo II de pancreas de cerdo(Sigma)	0–30 mM NaTDC	0–30 mM CaCl , 0.2 M NaCl	(110)
2.4 g TG	20–1000 TBU/ml Source: pancreatina	8 mM NaTC:1.5 mM lecitina	50 mM Tris–maleato, 5 mM CaCl ₂ , 150 mM NaCl	(111)
500 ml de TG emulsionado con lecitina	231028 M Lipasa and 131027M colipasa /10 ml Source: purificado de pancreas de cerdo	4 mM NaTDC	1 mM Tris–maleato, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂	(112)
1–2 ml de TG emulsionado con lecitina 20%	1028–1027 M Lipasa and colipasa /10 ml Fuente: purificado de pancreas de cerdo	0–12 mM NaTDC	2 ml Tris–HCl, 150 mM NaCl, 0–20 mM Ca ⁺²	(113)

Tabla 1. Ejemplos de modelos de digestión *in vitro* de lípidos.

1. 4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Michael Bockisch (1998) Fats and Oils Handbook. ISBN 0-935315-82-9. (2) Casimir C. Akoh, David B. Min (2008) Food lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. *CRC Press QP751.F647*
- (3) Frank D. Gunstone, John L. Harwood, Albert J. Dijkstra (2007) The lipid Handbook. *CRC Press OP751.L547*
- (4) Ching Kuang Chow (2007) Fatty acids in foods and their health implication. *CRC Press QP752.F35F38*
- (5) Koji Nagao , Teruyoshi Yanagita (2008) Bioactive lipids in metabolic syndrome. Review. *Progress in Lipid Research* 47, p 127–146
- (6) Hans-Konrad Biesalski, Lars Ove Dragsted, Ibrahim Elmadfa, Rolf Grossklauss, Michael Müller, Dieter Schrenk, Paul Walter, Peter Weber, (2009) Bioactive compounds: Definition and assessment of activity, *Nutrition* 25; 1202-1205
- (7) Evangelos C. Rizos, Moses S. Elisaf (2013) Current evidence and future perspectives of omega 3 polyunsaturated fatty acids for the prevent of cardiovascular disease. *European Journal of Pharmacology* 706, 1-3
- (8) Anette Müllertz, Anayo Ogbonna, Shan Ren, Thomas Rades (2010) New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 62, 1622–1636
- (9) J Zigová, E Šturdík (2000) Advances in biotechnological production of butyric acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 153-160
- (10) P. Boyaval and C. Corre (1995) Production of propionic acid. *Le lait, Dairy Science and Tecnology*, 75, 453-461
- (11) Yoneda, N.; Kusano, S.; Yasui, M.; Pujado, P.; Wilcher, S. (2001). Recent advances in processes and catalysts for the production of acetic acid. *Applied Catalysis A, General* 221 (1-2): pp. 253-265.

- (12) Rombeau J, Kripke SA, Settle RG (1990) Short chain fatty acids: production, absorption, metabolism and intestinal effect. *Dietary Fiber-Plenum Press, New York* 317-337
- (13) Kleis KA, Chang EB (2006) Short chain fatty acids impact on intestinal adaptation, inflammation, carcinoma and failure. *Gastroenterology* 130 (2, supplement 1), 100-105
- (14) Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutuin S, Troost FJ, Brummer RJ (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology and therapeutics*, 27 (2), 104-119
- (15) Ooi CC, Good NM, Williams DB, Lewanowitsch T, Cosgrove LJ, Lockett TJ, Head RJ (2010) Efficacy of butyrate analogues in HT-29 cancer cells. *Clin Exper Pharm Physiol* 37, 482-489
- (16) Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archers SY, Hodin RA (2002) The effect of short chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *The Journal of Nutrition*, 132 (5) 1012-1017
- (17) Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC (2005) Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 495-528
- (18) Rodriguez-Cabezas MG, Gálvez J, Lorente MD, Concha A, Camuesco D, Azzouz S, Osuna A, Redondo L, Zarzuelo A (2002) Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor α and nitric oxide production in Trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *The Journal of Nutrition* 132 (11), 3263-3271
- (19) Steven JM, Gary PZ, Hoggatt AM, Labarrere C, Page Faulk W (2005) Short-chain fatty acids modulate gene expression for vascular endothelial cell adhesion molecules, *Nutrition* 21(6), 740-748
- (20) Vidyasagar S, Ramakrishina BS (2002) Effects of butyrate on active sodium and chloride transport in rat and rabbit distal colon. *The Journal of Physiology* 539 (1), 163-173

- (21) Graciani E (2006) Los aceites y grasas: composición y propiedades. 1 ed. Madrid. *Ediciones Madrid Vicente*.
- (22) Kazunori Koba, Teroyoshi Yanagita (2013) Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obesity Research and Clinical Practice*.
- (23) Eduardo Lopez-Huertas (2010) Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research* 61 (3), 200-207
- (24) Kazunori Koba, Teroyoshi Yanagita (2013) Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obesity Research and Clinical Practice*.
- (25) Thomas Obsen, Nils J Faergeman, Soonkyu Chung, Kritina Martinez, Semone Gobern, Olivier Loreau, Martin Wabitsch, Susanne Mandrup, Michael McIntosh. *Trans-10, cis-12* conjugated linoleic acid decreases *de novo* lipid synthesis in human adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23 (6), 580-590
- (26) Attar-Bashi NM, Weisinger RS, Begg DP, Li D, Sinclair AJ (2007) Failure of conjugated linoleic acid supplementation to enhance biosynthesis of docosahexaenoic acid from α -linolenic acid in healthy human volunteers. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 76 (3), 121-130
- (27) Iwata T, Kamegai T, Yamauchi-Sato Y, Ogawa A, Kasai M, Aoyama T, Kondo K (2007) Safety of dietary conjugated linoleic acid (CLA) in a 12-weeks trial in healthy overweight Japanese male volunteers. *Journal of Oleo Science*, 56 (10), 517-525
- (28) Park Y, Pariza MW (2007) Mechanism of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Research International* 40 (3), 311-323
- (29) Kelley NS, Hubbard NE, Erickson KL (2007), Conjugated Linoleic acid isomers and cancer. *The Journal of Nutrition*, 12, 2599-2607
- (30) Changhva L, Jindong Y, Defa L, Lidan Z, Shiyan Q, Jianjux (2005) Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression of proinflammatory

cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide. *The Journal of Nutrition*, 135 (2), 239-244

(31) CM Reynolds, HM Roche (2010) Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signaling. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 82, 199-204

(32) Banu J, Bhattacharya A, Rahman M, O'shea M, Fernandez G (2006) Effects of conjugated linoleic acid and exercise on bone mass in young male Balb/C mice. *Lipids in health and disease*, 5 (1):7, 1-9

(33) Arion Kennedy, Kristina Martinez, Soren Schmidt, Susanne Mandrup, Kathleen LaPoint, Michael McIntosh. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21 (3), 171-179

(34) Seong-Koon Lo, Chin-Ping Tan, Kamariah Long, Mohd. Suria Affandi Yusoff, Oi-Ming Lai (2008) Diacylglycerol Oil—Properties, Processes and Products: A Review. *Food Bioprocess Technology*, 1, 223-233

(35) Kristensen, J. B., Jørgensen, H., & Mu, H. (2012). Absorption difference between diacylglycerol oil and butter blend containing diacylglycerol oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(2), 146-152

(36) Yanai, H., Tomono, Y., Ito, K., Hirowatari, Y., Yoshida, H., & Tada, N. (2010). A molecular mechanism for diacylglycerol-mediated promotion of negative caloric balance. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 3, 1.

(37) Takeno N, Shimotoyodome A & Meguro S (2009). Inhibitor of increase in postprandial blood insulin. *US Patent* No 2009/0124691 A1.

(38) Maria Manuela Camino Feltes, Débora de Oliveira, Jane Mara Block, Jorge Luiz Ninow (2013) The Production, Benefits, and Applications of Monoacylglycerols and Diacylglycerols of Nutritional Interest. *Food Bioprocess Technology*, 6, 17-35

(39) Hallgren Band Sharsson (1962). The glyceryl ethers in man and cow. *Journal of Lipid Research*, 3 (1), 39-43

- (40) Carlos D Magnusson, Gudmundur G Haraldsson (2011) Chemistry and Physics of lipids. *Ether Lipids*, 164, 315-340
- (41) C Cheminade, V Gautier, A Hichami, P Allaume, D Le Lannou and A B. Legrand (2002) 1-O-Alkylglycerols Improve Boar Sperm Motility and Fertility. *Biology of Reproduction*, 66 (2), 421-428
- (42) DJ Mcnamara (2013) Cholesterol: Sources, Absorption, Function, and Metabolism, *Encyclopedia of Human Nutrition* (Third Edition), 341-345
- (43) William Dowhan (1997) The role of phospholipids in cell function, *Advances in Lipobiology*, 2, 79-107
- (44) DJ Gordon, J L Probstfield; R J Garrison; J D Neaton; W P Castelli; J D Knoke; D R Jacobs Jr; S Bangdiwala; H A Tyroler (1989) High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Journal of American Heart Association*, 79, 8-15
- (45) Demosthenes B Panagiotakos, Christos Pitsavos, Yannis Skoumas, Yannis Lentzas, Labros Papadimitriou, Christina Chrysohoou and Christodoulos Stefanadis (2008) Abdominal obesity, blood glucose and apolipoprotein B levels are the best predictors of the incidence of hypercholesterolemia (2001–2006) among healthy adults: the ATTICA Study. *Lipids in Health and Disease*, 7-11
- (46) V. Spitzer, S. Maggini (2013) Chapter 26 – Phytosterols and Micronutrients for Heart Health, *Bioactive Food as Dietary Interventions for Cardiovascular Disease*, 393-413 Edited by Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy
- (47) Gemma Brufau, Miguel Angel Canela, Magda Rafecas (2008) Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28, 217-225
- (48) Jingying Zhao, Pavel Gershkovich, Kisho M, Wasan (2012) Evaluation of the effect of plant sterols on the intestinal processing of cholesterol using an *in vitro* lipolysis model. *International Journal of Pharmaceutics*, 436, 707-710

- (49) Iwona Rudkowska (2010) Plant sterols and stanols for healthy ageing. *Maturitas*, 66, 158-162
- (50) Franca Marangoni, Andrea Poli (2010) Review: Phytosterols and cardiovascular health, *Pharmacological Research*, 61, 193-199
- (51) Awad AB, Fink CS. (2000) Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 130, 2127-30.
- (52) Awad AB, Chinnam M, Fink CS, Bradford PG. (2007) b-sitosterol activates Fas signalling in human breast cancer cells. *Phytomedicine*; 14: 747-54.
- (53) Bradford PG, Awad AB. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:161-70.
- (54) Gregor Cevc (1993) Phospholipids Hanbook. Marcel Dekker Inc. QP752.P53P468
- (55) http://163.178.103.176/Fisiologia/general/activ_bas_4/Boron2_2.jpg
- (56) Borgström B. Luminal digestion of fats. In: Go VLW, Dimagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA, editors. (1993) The pancreas: biology, pathobiology, and disease, *New York: Raven Press*, 475-488.
- (57) Espinosa-Salinas I, Rodriguez-Casado A, Molina S, Rodriguez-Gonzalez A, Ordovas JM, Ramirez de Molina A. (2011) Beneficial effects of bioactive phospholipids: genomic bases. *Current Nutrition and Food Science*, 7, 145-154.
- (58) PJH Jones, D E MacDougall, F Ntanios, C A Vanstone (1997) Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1997, 75(3), 217-227
- (59) Torres, C. F.; Martin, D.; Torrelo, G.; Casado, V.; Fernandez, O.; Tenllado, D.; Vazquez, L.; Moran-Valero, M. I.; Reglero, G. Lipids as delivery systems to improve the biological activity of bioactive ingredients. *Curr. Nutr. Food Sci.* (2011), 7, 160-169.

- (60) Li, Y., Le Maux, S., Xiao, H., McClements, D. (2009). Emulsion-based delivery systems for tributyrin, a potential colon cancer preventive agent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9243-9249.
- (61) Clarke, J., Bird, T., Topping, D., Young, G., Cobiac, L. (2006). Effect of resistant starch, butyrylated starch and tributyrin on colon cancer in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 21, A270-A270.
- (62) Demonty I, Chan Y, Pelled D, Jones PJH. Fish-oil esters of plant sterols improve the lipid profile of dyslipidemic subjects more than do fish-oil or sunflower oil esters of plant sterols. *Am J Clin Nutr* 2006; 84, 1534-42.
- (63) Miyamoto S, Koga T, Terao J. (1998) Synthesis of a novel phosphate ester of a vitamin E derivative and its antioxidative activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*; 62, 2463-6.
- (64) Torres, C., Vazquez, L., Senorans, F., Reglero, G. (2009). Enzymatic synthesis of short-chain diacylated alkylglycerols: a kinetic study. *Process biochemistry*, 44, 1025-1031.
- (63) Maurelli S, Blasi F, Cossignani L, Bosi A, Simonetti M, Damiani P. (2009) Enzymatic synthesis of structured triacylglycerols containing CLA isomers starting from sn-1,3-diacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*; 86, 127-33.
- (64) Muñio M, Robles A, Esteban I, Gonzalez PA, Molina E. (2009) Synthesis of structures lipids by two enzymatic steos: athanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols. *Porcess Biochemistry*, 44, 723-730
- (65) Torrelo, G.; Torres, C. F.; Reglero, G. (2012) Enzymatic strategies for solvent-free production of short and medium chain phytosteryl esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 114, 670-676.
- (66) Naalsund T, Malterud KE, Partali V, Sliwka HR (2001) Synthesis of a triantioxidant compound: combination of [beta]-apo-8'-carotenoic acid, selenacapyloic acid and trolox in a triglyceride, *Chemistry Physics Lipids*, 112, 59-65

- (67) Reddy KK, Shanker KS, Ravinder T, Prasad RBN, Kanjilal S. (2010) Chemo-enzymatic synthesis and evaluation of novel structured phenolic lipids as potential lipophilic antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 600-8.
- (68) Kutney JP, Milanova RK, Ding Y, Chen H, Duanjie H. Novel structures comprising phytosterol and/or phytostanol and ascorbic acid and use thereof in treating or preventing cardiovascular disease, its underlying conditions and other disorders. *US Patent Application* 20020156051, 2002
- (69) Madrona A, Pereira-Caro G, Mateos R, *et al.* (2009) Synthesis of hydroxytyrosol alkyl ethers from olive oil waste waters. *Molecules*; 14, 1762-72.
- (70) Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. (2010) Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Review*, 68, 191-206.
- (71) Killeen MJ, Pontoniere P, Crea R. (2011) Hydroxytyrosol. An examination of its potential role in cardiovascular disease, inflammation, and longevity. *AgroFood Industry Hi-Tech*, 22, 16-29
- (72) Cornwell D G, Ma J. (2008) Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 8774-8786.
- (73) Casado V, Reglero G, Torres CF. (2014) Novel and efficient solid to solid transphosphatidylation of two phenylalkanols in a biphasic GRAS medium. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 99, 14-19.
- (74) Elisabet Fernández-García, Irene Carvajal-Lérida, Antonio Pérez-Gálvez (2009) In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency, *Nutrition Research*, 29, 751-760
- (75) Christophe AB, Vreise S (2000) Fat digestion and absorption. ISBN: 1-893997-12-X

- (76) Harold Ira Friedman, Barbara Nylund (1980) Intestinal fat digestion, absorption and transport. *The American Journal of Clinical Nutrition*, volume 1108-1139
- (77) Bengt Borgström (1974) Fat Digestion and absorption. *Biomembranes*, 4, 555-620
- (78) Martin C Carey, Donald M Small, Charles M Bliss (1983) Lipid digestion and absorption. *Annual Review Physiology*, 45, 551-677
- (79) <http://www.asturnatura.com/articulos/nutricion/energia-nutrientes-componentes-dieta/lipidos.php>
- (80) W. B. Cannon (1898) Movements of the Stomach, Studied by Means of the Röntgen Rays. *Journal of the Boston Society of Medical Science*, 2 (6), 59-66
- (81) <http://perfildelipidos.blogspot.com.es/2011/05/metabolismo-de-los-lipidos.html>
- (82) Alton Meister (1961) Advances in enzymology and related areas of Molecular Biology, volume 23. Pancreatic Lipase. *Interscience Publishers, inc.*
- (83) E. Bauer, S. Jakob, R. Mosenthin (2005) Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 18, 282-295
- (84) David Y. Hui, Philip N. Howles (2002) Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 43, 2017-2030
- (85) Cam T. Phan and Patrick Tso (2001) Intestinal lipid absorption and transport. *Frontiers in Bioscience*, 6, 299-319
- (86) Ichiro Kudo, Makoto Murakami (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 68-69, 3-58
- (87) P.J. Wilde, B.S. Chu (2011) Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165, 14-22

- (88) A. F. Hofmann, and D M Small (1967) Detergent Properties of Bile Salts: Correlation with Physiological Function. *Annual Reviews of Medicine*, 18, 333-376
- (89) Eugene P. DiMagno, Vay L. W. Go, W. H. J. Summerskill, (1973) Relations between Pancreatic Enzyme Outputs and Malabsorption in Severe Pancreatic Insufficiency. *Journal of Medicine*, 288, 813-815
- (90) Jahangir Iqbal , M. Mahmood Hussain (2009) Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 296, 1183-1194
- (91) Sun Jin Hur, Beong Ou Lim, Eric A. Decker, D. Julian McClements (2011) *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-12
- (92) David Julian McClements and Yan Li (2010) Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food and Function*, 1, 32-59
- (93) M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A.Mackie, S. Marze, D.J. McClements, O. Ménard, I. Recio, C. N. Santos, R.P. Singh, G.E. Vegarud, M.S.J. Wickham, W. Weitschies and A. Brodtkorb (2014) A standardised static in-vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*, 1-22
- (94) Christopher J.H. Porter, Ann Marie Kaukonen, Agnes Taillardat-Bertschinger, Ben J. Boyd, Jacquelyn M. O'Connor, Glenn A. Edwards and William N. Charman (2004) Use of *in vitro* lipid digestion data to explain the *in vivo* performance of triglyceride-based oral lipid formulations of poorly water-soluble drugs: Studies with halofantrine *Journal of Pharmaceutical Sciences* volume, 1110–1121
- (95) Leab Sek, Christopher J. H. Porter, Ann Marie Kaukonen and William N. Charman (2002) Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54, 29-41

- (96) Niels Hønborg Zangenberg, Anette Müllertz, Henning Gjelstrup Kristensen, Lars Hovgaard (2001) A dynamic *in vitro* lipolysis model: II: Evaluation of the model, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, 237-244
- (97) Arik Dahan, Amnon Hoffmanm (2006) Use of a Dynamic *in Vitro* Lipolysis Model to Rationalize Oral Formulation Development for Poor Water Soluble Drugs: Correlation with *in Vivo* Data and the Relationship to Intra-Enterocyte Processes in Rats, *Pharmaceutical Research* 23, 2165-2174
- (98) Ann Marie Kaukonen, Ben J. Boyd, Christopher J. H. Porter, William N. Charman (2004) Drug Solubilization Behavior During *in Vitro* Digestion of Simple Triglyceride Lipid Solution Formulations, *Pharmaceutical Research*, 21, 245-253
- (99) Dimitrios G. Fatouros, Bjorn Bergenstahl, Anette Mullertz (2007) Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during *in vitro* digestion, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31, 85–94
- (100) Aurélie Guerra, Lucie Etienne-Mesmin, Valérie Livrelli, Sylvain Denis, Stéphanie Blanquet-Diot, Monique Alric (2012) Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion, *Trends in biotechnology*, 30, 591-600
- (101) Anne T. Larsen, Philip Sassene, Anette Müllertz, (2011) *In vitro* lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 417, 245-255
- (102) Selena Di Maio, Rebecca L. Carrier (2011) Gastrointestinal contents in fasted state and post-lipid ingestion: *In vivo* measurements and *in vitro* models for studying oral drug delivery *Journal of Controlled Release*, 151, 110-122
- (103) B. Brogtrom, A Dahlqvist, G Lundh, J Sjoval, Studies of Intestinal digestion and absorption in the Human 36(10): 1521–1536. *Journal of clinical investigation*
- (104) B Borgström (1964) Influence of bile salt, pH, and time on the action of pancreatic lipase; physiological implications *Journal of lipid research*, 84, 522-531

- (105) Martine Armand, Patrick Borel, Pascale Ythier, Guy Dutot, Christian Melin, Michèle Senft, Huguette Lafont, Denis Lairon (1992) Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase: an in vitro study, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 3 (7), 333-341
- (106) M. Minekus, M. Smeets-Peeters, A. Bernalier, S. Marol-Bonnin, R. Havenaar, P. Marteau, M. Alric, G. Fonty, J. H. J. Huis in't Veld (1999) A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 108-114
- (107) Sun Jin Hur, Eric A. Decker, D. Julian McClements (2009) Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during *in vitro* digestion, *Food Chemistry*, 114, 253-262
- (108) Ravi Devraj, Hywel D. Williams, Dallas B. Warren, Kazi Mohsin, Christopher J.H. Porter, Colin W. Pouton, (2013) In vitro assessment of drug-free and fenofibrate-containing lipid formulations using dispersion and digestion testing gives detailed insights into the likely fate of formulations in the intestine, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49, 748-760
- (109) Ahmed Abdalla, Sandra Klein, Karsten Mäder (2008) A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: Characterization, dissolution, *in vitro* digestion and incorporation into solid pellets, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35, 457-464
- (110) Sandra Sandra, Eric Andrew Decker and David Julian McClements (2008) Effect of Interfacial Protein Cross-Linking on the in Vitro Digestibility of Emulsified Corn Oil by Pancreatic Lipase, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 7488-7494
- (111) Maud Beysseriat, Eric A. Decker, D. Julian McClements (2006) Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an in vitro human digestion model, *Food Hydrocolloids*, 20, 800-809

(112) Arik Dahan, Amnon Hoffman (2007) The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: The ability of *in vitro* lipolysis and consecutive *ex vivo* intestinal permeability data to predict *in vivo* bioavailability in rats, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 96-105

(113) Dimitrios G. Fatouros, Bjorn Bergenstahl, Anette Mullertz (2007) Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during *in vitro* digestion, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31, 85-94

(114) Leab Sek, Christopher J.H Porter, William N Charman (2001) Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their *in vitro* digestion products, by HPTLC coupled with *in situ* densitometric analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 651-661

(115) Porteer, C., Kaukonen, A. M., Taillardat-Bertschinger, A., Boyd, B. J., O'Connor, J. M., Edward, G. A., et al (2004). Use of *in vitro* lipid digestion data to explain the *in vivo* performance of triglyceride-based oral lipid formulations of poorly water-soluble drugs: Studies with halofantrine. *Journal of Pharmaceutical Science*, 93, 1110-1121

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II: “OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO”

2.1. OBJETIVOS

El trabajo de la presente Tesis ha sido desarrollado dentro del marco de varios proyectos de investigación del grupo IAF-UAM, todos ellos relacionados con el desarrollo y producción de diferentes compuestos lipídicos de síntesis con interés bioactivo. En concreto, entre los compuestos sintetizados por el grupo IAF-UAM, y que ya han sido mencionados anteriormente, se consideran de gran interés tres de ellos, por basarse en tres tipos de estructuras lipídicas distintas (alquilglicerol, PS y PL), y que han sido planteados con distintas funcionalidades bioactivas. Se trata de alquilglicerol esterificado con ácido butírico (D-SCAKG) (1), fitosterol esterificado con CLA (PS-CLA) (2), o fosfolípidos esterificados con hidroxitirosol en su cabeza polar (PHT) (3). Para todos ellos, con el fin de indagar en su potencial, se consideró relevante plantear la evaluación de su proceso de digestión intestinal mediante la aplicación de modelos de digestión *in vitro*, así como indagar a través de los estudios de digestión, en otros aspectos adicionales más relacionados con su bioactividad.

Por tanto, en base a este planteamiento, el **objetivo principal** de la presente Tesis fue:

- El desarrollo y aplicación de modelos de digestión intestinal *in vitro* en la evaluación del proceso de digestión y el estudio de la potencial bioaccesibilidad de diferentes compuestos lipídicos con un potencial carácter bioactivo.

Adicionalmente, en base al objetivo principal, se establecieron una serie de **objetivos específicos** para cada uno de los productos lipídicos de estudio:

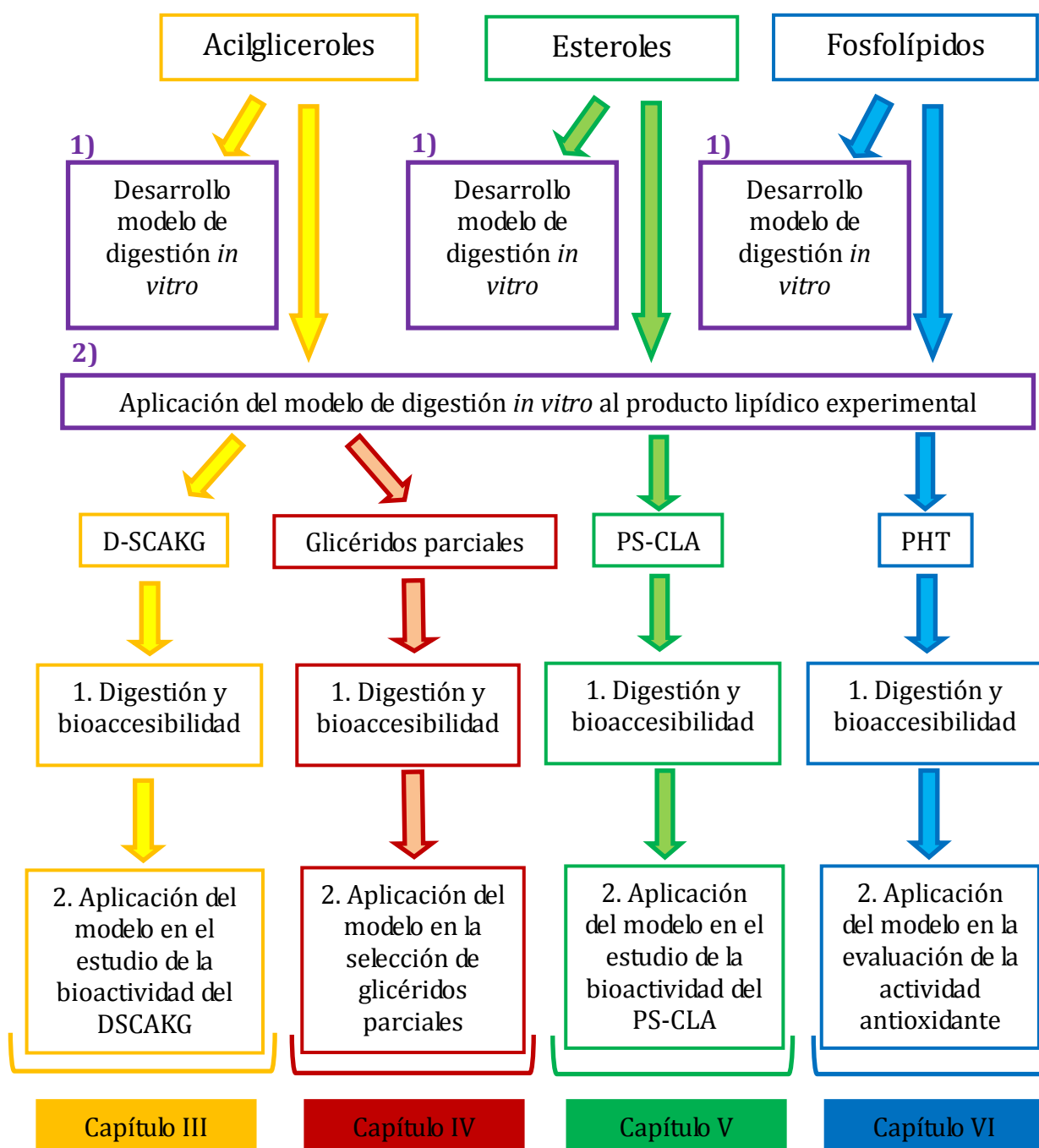
- Acilglicerol y alquilglicerol
 - Desarrollo de un modelo de digestión intestinal *in vitro* de triglicéridos y su aplicación en la digestión del producto experimental D-SCAKG

OBJETIVO DEL TRABAJO

- Aplicación del modelo en el estudio del efecto de la digestión sobre la bioactividad del D-SCAKG en modelos celulares de cáncer de colon
- Glicéridos parciales
 - Aplicación del modelo de digestión intestinal *in vitro* de triglicéridos en la digestión de glicéridos parciales para la selección de formas glicéridas o sus mezclas con diferentes fines
- Esteres de esteroide
 - Desarrollo de un modelo de digestión intestinal *in vitro* de ésteres de esteroide y su aplicación en la digestión del producto experimental PS-CLA
 - Aplicación del modelo de digestión en el estudio del efecto hipocolesterolémico del PS-CLA
- Fosfolípidos
 - Desarrollo de un modelo de digestión intestinal *in vitro* de fosfolípidos y su aplicación en la digestión del producto experimental PHT
 - Aplicación del modelo de digestión en la evaluación del efecto de la digestión sobre la actividad antioxidante de PHT

2.2. PLAN DE TRABAJO

Los objetivos específicos planteados anteriormente se han estructurado en distintos capítulos a lo largo de la presente Tesis, siguiendo el plan de trabajo esquematizado que se muestra a continuación. Se detalla de manera esquemática los pasos seguidos para cada uno de los sustratos lipídicos de estudio, que posteriormente serán descritos en cada capítulo correspondiente.



2.3. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Torres, C., Vazquez, L., Senorans, F., Reglero, G. (2009). Enzymatic synthesis of short-chain diacylated alkylglycerols: a kinetic study. *Process biochemistry*, 44 , 1025-1031.
- (2) Torres, C. F.; Torrelo, G.; Vazquez, L.; Señorans, F. J.; Reglero, G. (2008). Stepwise esterification of phytosterols with conjugated linoleic acid catalyzed by *Candida rugosa* lipase in solvent-free medium. *J. Biosci. Bioeng.*, 106, 559-562.
- (3) Casado V, Reglero G, Torres CF. (2014) Novel and efficient solid to solid transphosphatidylation of two phenylalkanols in a biphasic GRAS medium. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 99, 14-19.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III: “DESARROLLO DE UN MODELO DE DIGESTIÓN *IN VITRO* PARA ACILGLICEROLES Y SU APLICACIÓN A ALQUILGLICEROLES ESTERIFICADOS CON ÁCIDO BUTÍRICO”

Publicado en:

1. *Lipids*, 46, 277-285. 2011

2. *Chemistry and Physics of Lipids*, 175, 50-56. 2013

3.1. INTRODUCCIÓN

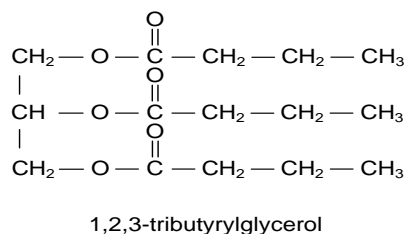
El interés bioactivo del ácido butírico fue comentado en el Capítulo I de la presente Tesis, siendo un SCFA de especial interés en los últimos años por su interferencia en la patogénesis de diversos cánceres, como el cáncer de colon, el de mama, el de próstata, el hepatocarcinoma y la leucemia (1-5).

Sin embargo, la aplicación del ácido butírico como un agente antitumoral se encuentra bastante limitada debido a que es difícil alcanzar concentraciones en plasma que le permitan actuar de manera eficiente como agente antiproliferativo (3, 6). Este fenómeno tiene lugar debido a su rápida metabolización, que da lugar a una vida media del ácido butírico bastante corta en plasma. Por este motivo, hoy en día hay un especial interés en buscar alternativas que permitan mantener la concentración del ácido butírico en plasma lo suficientemente elevada para ejercer su bioactividad. En este sentido, las principales estrategias tratan de buscar nuevas formas de vehiculización de ácido butírico para poder utilizarlo como agente terapéutico. Actualmente en la bibliografía científica se pueden encontrar pro-fármacos de síntesis de ácido butírico con esta finalidad, destacando especialmente la tributirina (TB) como la forma más popular (3, 7).

Una alternativa de vehiculización del ácido butírico, planteada y desarrollada por el grupo de investigación de IAF-UAM, es su esterificación con un alquilglicerol (D-SCAKG) (8) (figura 1). Así, la ventaja que presentaría esta nueva estructura lipídica sería la combinación, en una misma molécula, de dos componentes

lipídicos potencialmente bioactivos, ácido butírico y alquilglicerol (Capítulo I, apartado 1.2.2.2.c).

a) TB



b) D-SCAKG

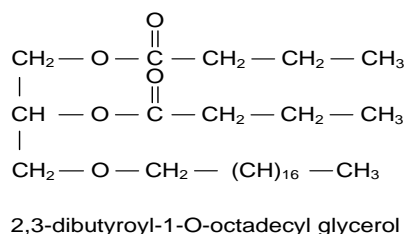


Figura 1. Triradilgliceroles esterificados con ácido butírico

A la hora de evaluar el potencial de los nuevos lípidos D-SCAKG en cuanto a su digestión y bioaccesibilidad, hay que tener en cuenta que hoy en día se conoce bastante bien el proceso de digestión y absorción de los lípidos habituales de la dieta, como los TG, en cambio, apenas se tiene información de cómo se digieren y se distribuyen los alquilgliceroles, tanto libres como esterificados. Algunos autores han señalado que la tasa de hidrólisis en alquilgliceroles diesterificados con FA de cadena larga o PUFAs es menor en comparación con sus análogos en forma de TG (11-13). Por otro lado, tampoco se tiene información concreta acerca del proceso de absorción intestinal de los alquilgliceroles, aunque existen algunas evidencias científicas de que los alquilgliceroles de la dieta se pueden absorber completamente a nivel intestinal (14, 15), sin embargo, el mecanismo exacto de absorción aún se desconoce. Por lo tanto, cualquier indagación en cuanto al comportamiento digestivo de alquilgliceroles en general, independientemente de que se trate de la forma D-SCAKG, contribuiría al conocimiento científico de estas formas lipídicas de interés.

3.2. OBJETIVOS

A. Proceso de digestión intestinal de D-SCAKG

El primer objetivo de este trabajo fue realizar el estudio de la digestión intestinal del lípido D-SCAKG, mediante un modelo de digestión intestinal *in vitro*, y su comparativa con un vehículo análogo de ácido butírico en forma de triglicérido (TB), con la intención de estudiar las diferencias entre la velocidad y el grado de hidrólisis, los productos de hidrólisis que se liberan durante la reacción y la potencial bioaccesibilidad de cada uno de ellos.

Para poder llevar a cabo este estudio, previamente se desarrolló el modelo de digestión intestinal *in vitro* para un lípido estándar en forma de TG. Con este paso previo se pretendió verificar que el modelo de digestión intestinal *in vitro* era capaz de reproducir resultados fisiológicos, y que los resultados que se observaran tras su aplicación a TB y D-SCAKG no presentarían artefactos debidos al modelo desarrollado.

B. Aplicación del modelo de digestión intestinal *in vitro* en la evaluación de la bioactividad de D-SCAKG en modelos celulares de cáncer de colon

El segundo objetivo del trabajo fue conocer la potencial actividad anticarcinogénica del D-SCAKG como vehículo lipídico del ácido butírico en una línea de células tumorales de colon, tanto del compuesto sin digerir, así como del compuesto una vez digerido. A su vez, se evaluó la bioactividad de cada uno de los productos de digestión del D-SCAKG de manera individual, con la finalidad de indagar en la actividad biológica de cada producto de digestión.

Por otro lado, se planteó el estudio del efecto que supone sobre el grado de bioactividad la solubilización de los productos lipídicos en estructuras micelares mixtas formadas por SB y PL, simulando así la forma de distribución física que adoptarían fisiológicamente los productos de digestión para poder acceder a las células intestinales. Para ello, se estableció la comparativa correspondiente con los productos sin micelar.

La presente actividad se llevó a cabo en colaboración con el Instituto IMDEA Alimentación, bajo la dirección de la Dra. Ana Ramírez.

3.3. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Proceso de digestión intestinal de D-SCAKG

Muestras lipídicas y reactivos

Las muestras lipídicas utilizadas fueron D-SCAKG, TB y aceite de oliva. El D-SCAKG fue previamente sintetizado por otros miembros del grupo de investigación IAF-UAM de acuerdo con una metodología puesta a punto por el mismo (8). La TB fue adquirida a Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania) y como lípido estándar, en el desarrollo del modelo de digestión, se utilizó aceite de oliva comercial.

Los reactivos utilizados a lo largo del estudio fueron, por un lado, lecitina, SB, trizma, maleato y pancreatina procedente de páncreas de cerdo, adquiridos a Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania), y por otro lado, NaCl, CaCl₂ y sulfato sódico anhidro adquiridos a Panreac (Barcelona, España). Los disolventes utilizados para la extracción y para el análisis de los diferentes lípidos del ensayo fueron de grado HPLC adquiridos a Lab-Scan (Dublin, Irlanda).

Modelo de digestión *in vitro*

El modelo de digestión intestinal *in vitro* se basó en un modelo previamente desarrollado por el grupo de investigación IAF-UAM para digerir productos lipídicos ricos en ω 3 (16). Sin embargo, este modelo de partida se consideró un modelo muy preliminar que no alcanzaba a reproducir los resultados fisiológicos observados en la bibliografía científica en cuanto al grado de hidrólisis y nivel de especies lipídicas generadas, por lo que se realizaron una serie de modificaciones sobre el modelo para tratar de reproducir resultados más fisiológicos (17).

Dentro de los principales parámetros modificados del modelo de digestión destacaron los siguientes:

- El incremento de la relación enzima/sustrato
- El aumento de las concentraciones de SB y PL

- La pre-emulsión del medio de digestión
- La preparación de la pancreatina como un extracto fresco
- La reducción del tiempo de digestión

El razonamiento del porqué de cada uno de estos cambios, así como la relevancia que tienen en el modelo final, serán discutidos más adelante en el apartado 4.1.

El modelo finalmente desarrollado se describe a continuación:

- 1 g de muestra lipídica se mezcló con 500 mg de SB, 200 mg de lecitina, 3 mL de una solución de NaCl 3,25 M, 1 mL de una solución de CaCl₂ 325 mM, y 54 mL de tampón Trizma-Maleato pH 7,5 (0,1 M para las muestras de aceite de oliva, y 1 M para las muestras de TB y D-SCAKG).
- Todo el medio fue homogeneizado (Ultra-Turrax IKA T18) durante 25 min a 7000 rpm.
- La mezcla homogeneizada se traspasó a un vaso termostatzado a 37°C con agitación magnética continua a 1000 rpm.
- La digestión intestinal comenzó con la adición de extracto fresco de pancreatina que se preparó del siguiente modo: 1 g de pancreatina disuelto en 6 mL de tampón Trizma-Maleato a pH 7,5, posteriormente agitado durante 10 min y centrifugado a 1600 x g a 5°C durante 15 min. El sobrenadante acuoso obtenido se adicionó al medio de reacción y el precipitado obtenido fue descartado.

Para poder estudiar la evolución de la digestión en el tiempo, así como la evaluación del punto final de la digestión, se tomaron alícuotas de 450 mg del medio de reacción a 0, 2, 4, 10, 20, 30 y 60 min.

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Separación de fases

Una vez terminada la digestión intestinal *in vitro* de los lípidos de partida, el medio de digestión se centrifugó a 4000 rpm, a 20°C durante 40 min, de acuerdo con el protocolo llevado a cabo por Soler et al (18). Tras la centrifugación, el medio

de digestión intestinal se separó en 3 fases claramente diferenciadas. Una fase superior, denominada Fase Oleosa (OP), una fase intermedia, que es la mayoritaria de la tres fases, denominada Fase Micelar (MP), y una fase inferior, que frecuentemente es muy minoritaria, denominada Fase Precipitado (PP) (19). Se tomaron alícuotas de las diferentes fases del medio de digestión para su posterior análisis.

La importancia de llevar a cabo esta separación de fases, radica en el interés por conocer cómo se distribuyen los compuesto lipídicos de la digestión después de la hidrólisis. Este resultado permitirá evaluar la potencial bioaccesibilidad de los productos de la hidrólisis, ya que aquellos productos que se encuentren principalmente en la MP serán potencialmente más bioaccesibles que aquellos que se encuentren en la OP y en la PP, ya que estas dos fases tienden a contener, bien lípidos residuales que serían potencialmente digeridos en tramos más alejados del tracto digestivo (principalmente TG y DG residuales sin digerir), o bien lípidos que serían eliminados en heces (principalmente FFA).

Extracción lipídica

Los lípidos totales de las diferentes alícuotas fueron extraídos con una mezcla de *n*-hexano/metil-*ter*-butil eter (50:50, v/v) en un ratio de muestra: disolvente de 1:3 (v/v). En el caso de los ensayos llevados a cabo con TB y D-SCAKG, además se acidificó el medio de extracción con la adición de ácido clorhídrico (150 mM). El posterior análisis de las muestras procedentes de la digestión de TB y de D-SCAKG se realizó en presencia de *n*-dodecano (10 mg) que fue utilizado como estándar interno.

La mezcla de disolventes junto con la muestra fue agitada en vortex durante 1 min y centrifugada durante 10 min a 15000 rpm. Se recolectó la fase orgánica superior, la cual contenía los componentes lipídicos y se dejó reposar durante 2 h con sulfato sódico anhidro, para asegurar la eliminación de posibles trazas de agua de la muestra.

Análisis de los productos lipídicos

Los productos de hidrólisis del aceite de oliva (utilizado como TG de referencia) se analizaron mediante cromatografía de líquidos (HPLC) según el

método de análisis de lípidos neutros previamente optimizado por miembros del grupo de investigación IAF-UAM (20). En este método se utilizó una columna Kromasil silica 60 (250 mm X 4.6 mm de Análisis Vínicos, Tomelloso, España), acoplada a un horno CTO 10A VP 2, a una bomba LC-10AD VP, a un modulador de gradiente FCV-10AL VP, a un desgasificador DGU-14A y a un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-LT) de Shimadzu (Izasa, España). El método utilizado en este equipo de HPLC mantenía la temperatura de la columna durante todo el análisis a 35 °C. Se inyectaron 20 µL de la muestra a una concentración de 4 mg/mL en cloroformo y la cuantificación fue llevada a cabo mediante el uso de curvas de calibrado de los patrones más apropiados para el análisis (Sigma Aldrich, Alemania).

Los productos de hidrólisis de TB y de D-SCAKG fueron analizados mediante cromatografía de gases (GC), de acuerdo con un método analítico desarrollado por miembros del grupo de investigación IAF-UAM (21). Para llevar a cabo estos análisis se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 serie II, con sistema de inyección “on-column” y una columna capilar de 7 metros de 5% metil fenil silicona (Quadrex Corporation, New Haven, CT, USA), con un diámetro interno de 0,25 µm. Como pre-columna se utilizó un fragmento de columna desactivada de 12 cm y 530 µm de diámetro interno. Las temperaturas del inyector y del detector eran de 43 y 360°C respectivamente, y se aplicó el siguiente gradiente de temperaturas:

- Inicio del análisis a 40°C
- Calentamiento a 42°C/min hasta 250°C, y mantenimiento a esta temperatura durante 10 min
- Seguido de un calentamiento a 7,5°C/min hasta 325°C, y mantenimiento a esta temperatura durante 30 min

Como gas portador se utilizó Helio a una presión de 5,2 psi. La cuantificación de los compuestos se realizó mediante el uso de un estándar interno y la utilización de factores de respuesta previamente obtenidos para cada uno de los productos lipídicos.

B. Aplicación del modelo de digestión intestinal *in vitro* en la evaluación de la bioactividad de D-SCAKG

Muestras lipídicas

Bioactividad del D-SCAKG

Se evaluó la bioactividad del D-SCAKG sin digerir, así como del compuesto digerido. Para este segundo caso, se preparó una mezcla con las especies lipídicas que se generaron tras la digestión del D-SCAKG, de acuerdo a los resultados obtenidos en el apartado A (Tabla 1). Los productos de hidrólisis AKG (alquilglicerol no esterificado) y ácido butírico fueron de grado comercial (Sigma-Aldrich), mientras que el producto alquilglicerol monoesterificado (M-SCAKG) fue purificado a partir del medio de digestión. La purificación se realizó mediante fraccionamiento con columna semi-preparativa (Kromasil sil 5 μ m 250x10 mm, Análisis Vínicos) y HPLC (Agilent, USA).

Compuesto	%
Ácido Butírico	20,5
AKG	24,2
M-SCAKG	53,1
D-SCAKG	2,2

Tabla 1. Composición de la mezcla de especies lipídicas después de la digestión intestinal del D-SCKAG

Bioactividad de los productos de la hidrólisis micelados: Preparación de las micelas mixtas

Las micelas mixtas de lípidos-SB-PLs se prepararon con lecitina de huevo y taurocolato sódico. En primer lugar se disolvieron cantidades apropiadas de los compuestos lipídicos en 0,5 mL de hexano. Se prepararon además soluciones control conteniendo únicamente hexano, sin adición de compuestos lipídicos y soluciones control solamente con SB y PL, sin adición de compuestos lipídicos. Las

muestras se secaron mediante corriente de N₂ (N-Evap 111, Organomation Associates). A continuación, se añadieron 0,23 mg de lecitina disueltos en 0,575 mL de hexano y las muestras se volvieron a secar en las mismas condiciones. Se prosiguió con la adición de 500 µL de una solución 2 mM de taurocolato en etanol y un último paso de evaporación con N₂. Finalmente, el contenido secado se re-suspendió en 1 mL de medio de cultivo DMEM sin ningún suplemento, y se mezcló con 1 mL de DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos para poder crecer las células. Un volumen de 200 µL de esta mezcla fue añadido a cada uno de los pocillos de la placa de cultivo celular.

Cultivos celulares

Se cultivaron células de cáncer de colon humano de la línea SW620 en medio DMEM suplementado con un 10 % de FBS, 2 mM de glutamina y un 1% de un solución antibiótica-antimicótica, que contenía 10000 unidades/mL de penicilina base, 10000 µg/mL de estreptomicina base y 25000 ng/mL de amfotericina B. Se mantuvo el cultivo celular bajo condiciones estándar de temperatura (37°C), de humedad (95%) y de dióxido de carbono (5%).

Ensayo de viabilidad celular

Para medir la actividad antiproliferativa de D-SCAKG y de sus productos de digestión se utilizó el método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Para ello se llevaron las células en fase exponencial de crecimiento a placas de 96 pocillos, incorporándose un promedio de 6000 células por pocillo en un volumen final de 200 µL. Después de 24 horas de incubación se reemplazó el medio de cultivo por medio que contenía los productos que se pretenden estudiar a diferentes concentraciones. Estos ensayos se realizaron adicionando los productos tanto sin micelas, como en forma de micelas mixtas.

La viabilidad celular fue determinada tanto en el momento del tratamiento, para tener un control antes del tratamiento, como 48 horas después, para determinar el crecimiento celular. Para determinar el número de células viables, se adicionaron 20 µL de solución MTT (5 mg/mL en FBS) a cada pocillo y se llevó a incubación durante 3 horas. Seguidamente el medio fue eliminado y se adicionaron 200 µL de DMSO (dimetil sulfóxido) para disociar las células y re-suspender el

formazan (metabolito azul del MTT). Se cuantificó el producto formazan, el cual está directamente relacionado con el número de células viables, midiendo su concentración a 560 nm con un lector de placas espectrofotométrico (UVM 340 Biochrom, Cambridge). Los valores de concentración de cada uno de los productos correspondientes al IC50 (50% de viabilidad celular inhibida), GI50 (inhibición del 50% de crecimiento), TGI (inhibición total del crecimiento) y LC50 (50% de muerte celular) se calcularon de acuerdo con las definiciones de la NIH (National Institutes of Health) utilizando la regresión logística, concepto que se describe como la relación entre la respuesta a un tratamiento con una determinada sustancia y la dosis o concentración de dicha sustancia.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Desarrollo del modelo de digestión intestinal *in vitro*

Como se explicó anteriormente, antes de llevar a cabo la digestión intestinal *in vitro* de los dos productos de estudio (TB y D-SCAKG), partiendo de un modelo de digestión preliminar desarrollado por el grupo IAF-UAM (16), lo primero que se consideró necesario fue testar el modelo con un lípido estándar en forma de TG. Se seleccionó aceite de oliva como lípido estándar debido a que es un producto lipídico simple, natural y abundante en la dieta, cuyo TG mayoritario se considera la trioleína (TO).

Por otro lado, como referencia de resultados fisiológicos de la digestión de TG habituales de la dieta se consideraron los resultados obtenidos por Hoffman et al (17), por tratarse de uno de los trabajos más relevantes y completos sobre la composición lipídica del contenido luminal durante la digestión de lípidos en humanos (figura 1.a).

Uno de los principales aspectos iniciales a considerar fue el tipo de enzima a utilizar y la relación enzima/sustrato más adecuada. A la hora de seleccionar el medio enzimático se puede optar por la adición de la enzima pura responsable de la digestión lipídica, la lipasa pancreática, o bien un extracto pancreático rico en esta enzima, denominado pancreatina. El modelo preliminar de partida a partir del cual se llevaron a cabo las modificaciones utilizaba pancreatina como medio

enzimático (16). Igualmente, se optó por mantener el uso de la pancreatina como principal fuente de enzima lipolítica debido a que presenta ventajas respecto a la lipasa pancreática pura. Al tratarse de un extracto del páncreas, contiene no sólo lipasa pancreática, sino también el cofactor de esta, la co-lipasa.

En cuanto a la cantidad de pancreatina que se utilizó, debía encontrarse dentro de unos rangos determinados para permitir una digestión adecuada. Sin embargo, los niveles de pancreatina o lipasa pancreática que se ha descrito que son producidos *in vivo*, o que son utilizados *in vitro*, se ha podido observar que son muy variables en la bibliografía (16, 17). Además, no existe una uniformidad en cuanto a la forma de indicar los datos enzimáticos, habiéndose descrito en unos casos como unidades de actividad enzimática, o en otros, como unidades de carga enzimática. Ante esta circunstancia, se consideró como criterio a adoptar, la adición de una cantidad suficiente de pancreatina, y siempre dentro de un rango razonable a los descritos *in vivo*, que permitiera alcanzar un grado de hidrólisis similar a los descritos *in vivo* (17). Siguiendo este criterio, se pudo comprobar que el modelo preliminar de partida a partir del cual se desarrolló el presente modelo no alcanzaba un nivel suficiente de hidrólisis a las cantidades de pancreatina adicionada (figura 1.b). Tras varias pruebas de incremento progresivo de pancreatina, el grado de hidrólisis fisiológico fue finalmente alcanzado con la relación pancreatina/sustrato seleccionada de 1:1 (p/p).

Por otro lado, se han descrito en la bibliografía algunos trabajos de modelos de digestión *in vitro* donde se adicionaba la pancreatina en forma de un extracto fresco previamente preparado resuspendiendo la pancreatina en el tampón acuoso de digestión, dado que comercialmente la pancreatina es un extracto que se encuentra liofilizado y conservado a congelación (3, 8). Se llevaron a cabo diferentes pruebas utilizando la misma cantidad de pancreatina, adicionada directamente o mediante la preparación previa del extracto fresco, tal y como se detalló en el apartado 3.3.A. Los resultados mostraron que se alcanzaba un mejor grado de hidrólisis adicionando la enzima en forma de extracto fresco preparado en el momento, como efectivamente se había descrito previamente en estudios de la bibliografía (22).

Por otro lado, fue necesario llevar a cabo una modificación de la relación SB/PL. Este cambio se realizó teniendo en cuenta que en el modelo de digestión se

pretendía simular una situación de ingesta de alimentos. Habitualmente, en los modelos de digestión que se pueden encontrar en la bibliografía, se pueden simular tanto situaciones de ayuno (conocidas como “fasted state”), como situaciones de ingesta (conocidas como “fed state”). La diferencia más relevante entre ambas situaciones es que a nivel fisiológico la composición de la secreción biliar es muy diferente, de tal manera que en situación de ayuno, los niveles y proporciones de SB y PL son inferiores, mientras que tras una ingesta de alimento, se ve estimulada la secreción biliar, y por tanto, aumenta la concentración de SB y PL en el medio de digestión (19). Con el fin de adaptar el modelo de digestión de partida preliminar a una situación más cercana a “fed state”, se modificó la relación de SB y PL, de acuerdo a estudios *in vivo* previamente descritos en la bibliografía (23). Esta relación molar ha sido habitualmente descrita en una proporción molar de 4:1 SB/PL en “fed state”, por lo que se buscó mantener esta relación en el modelo optimizado (23, 24).

Por otro lado, otra de las modificaciones practicadas sobre el modelo inicial fue generar la pre-emulsión del medio de reacción. Con la incorporación de este paso al modelo de digestión *in vitro* se buscó simular la formación de las gotas lipídicas emulsionadas en el medio acuoso que tiene lugar a nivel gástrico (19), antes de la digestión intestinal. Esta pre-emulsión podría favorecer la formación de la interfase en la cual interviene la lipasa pancreática.

Finalmente, en la figura 1.c se representan los resultados obtenidos después de aplicar al modelo de digestión *in vitro* todos los cambios anteriormente mencionados. Tal y como se puede observar en la figura, estos cambios dieron lugar a un modelo de digestión *in vitro* capaz de reproducir resultados fisiológicos similares a los obtenidos en estudios *in vivo* previamente descritos en la bibliografía (17).

Adicionalmente, y con el fin de validar el modelo de digestión en cuanto a velocidad y grado de hidrólisis, y poder establecer el tiempo final de digestión, se procedió al estudio detallado de la digestión del aceite de oliva a lo largo del tiempo completo de digestión. El modelo preliminar de digestión de partida utilizaba unos tiempos de hidrólisis de 2 h (25). En la mayoría de los modelos de digestión descritos en la bibliografía se reproduce igualmente este tiempo de digestión intestinal de 2 h (22-24, 25). Sin embargo, a la hora de desarrollar el modelo consideramos que este tiempo no podía ser generalizable a cualquier situación. Por un lado, la hidrólisis y absorción de los TG en el intestino tiene lugar mayoritariamente en los primeros tramos del duodeno, donde el tiempo de tránsito puede llegar a ser inferior a 2 h. Por otro lado, es razonable pensar que no puede ser igual el tiempo requerido para llevar a cabo la digestión del gran volumen acuoso y de ingesta habitual que se encuentra en la luz intestinal, que el tiempo requerido para llevar a cabo la digestión *in vitro* del medio simulado en los modelos desarrollados (muy inferior a 100 mL y 1 g de muestra lipídica), en los cuales se han utilizado proporciones escalables a una ingesta habitual, para poder hacer comparables los resultados obtenidos.

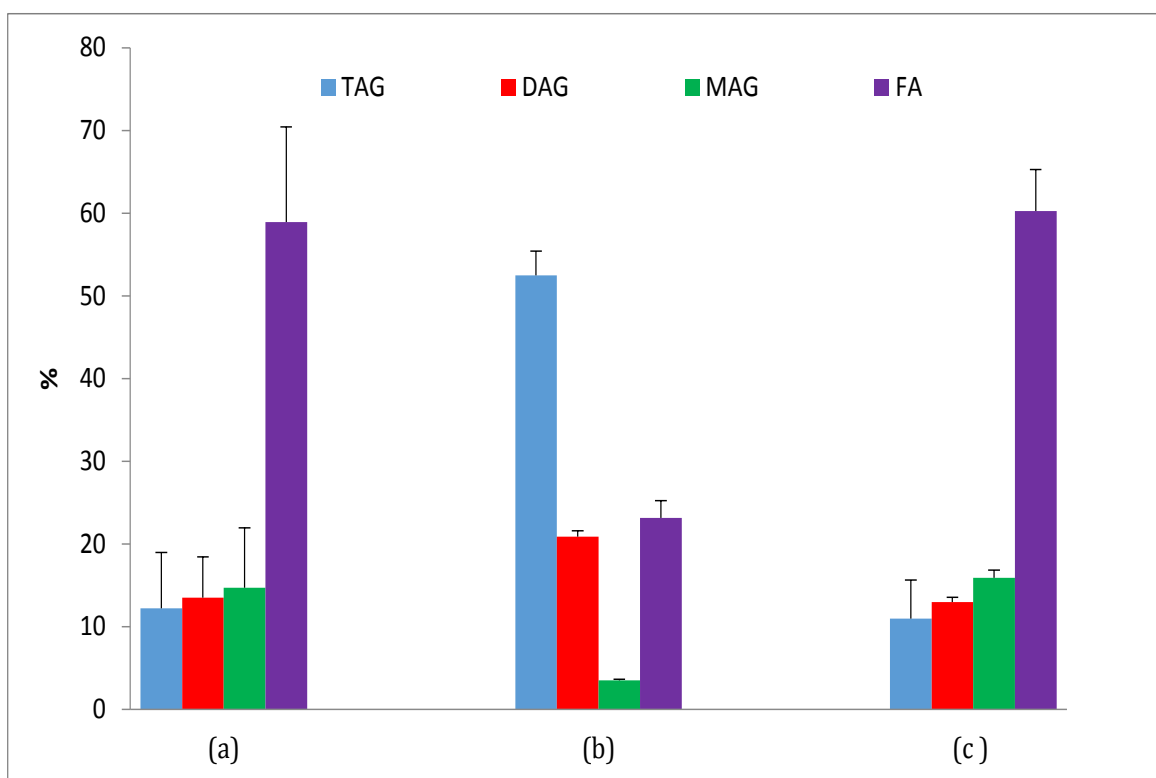


Figura 1. Productos lipídicos obtenidos de: a) Resultados *in vivo* (17), b) Modelo de digestión *in vitro* preliminar (16) y c) Modelo de digestión desarrollado

Por tanto, con el fin de poder establecer cuál debería ser el tiempo razonable a aplicar para simular una digestión intestinal *in vitro* de lípidos en los primeros tramos del duodeno se realizaron diferentes pruebas de hidrólisis a distintos tiempos de digestión, y se aplicó de nuevo el criterio seguido hasta ahora: encontrar el tiempo que diera lugar a una evolución de la digestión y un grado de hidrólisis final de TG comparable a los datos fisiológicos (17). En la figura 2 se representa la desaparición de producto y la aparición de sustratos a lo largo de 60 min de digestión, donde se observó que la digestión evolucionó razonablemente, tanto en especies lipídicas, como en grado y velocidad de hidrólisis, alcanzando resultados similares a los observados en la digestión de lípidos a nivel fisiológico.

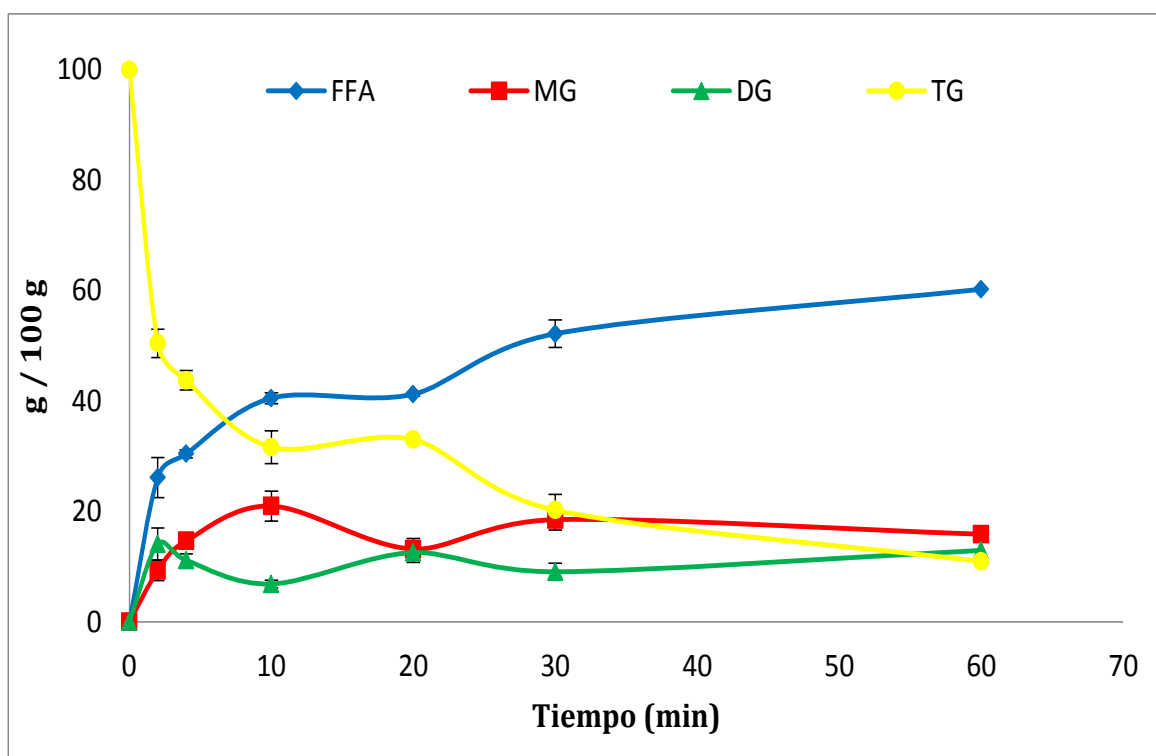


Figura 2. Evolución en el tiempo de los productos de digestión de aceite de oliva

Finalmente, para completar la validación del modelo de digestión, se evaluó la capacidad del modelo para reproducir resultados fisiológicos de bioaccesibilidad de los productos liberados durante la digestión. En la figura 3 se representan los resultados de la composición en productos lipídicos de las fases del medio de digestión, MP y OP. La PP en este ensayo fue minoritaria, por lo que no se representa en la figura 3. Los resultados del análisis de la composición lipídica de

cada una de las fases indicaron que los lípidos totales del medio de digestión se dividieron entre las dos fases, distribuyéndose un 94% del total de los lípidos en la MP y un 6% del total de los lípidos en la OP. Estos resultados indicaron que prácticamente la totalidad de los productos liberados de la hidrólisis del aceite de oliva eran potencialmente bioaccesibles. Por otro lado, la composición en especies lipídicas que presentaba la MP consistió fundamentalmente en productos de digestión (FFA y MG), mientras que la OP constó fundamentalmente de productos residuales sin digerir (TG). Estos resultados se encontraban en concordancia con lo que se había observado en la composición lipídica a nivel intraluminal durante la digestión fisiológica de grasa en humanos (17).

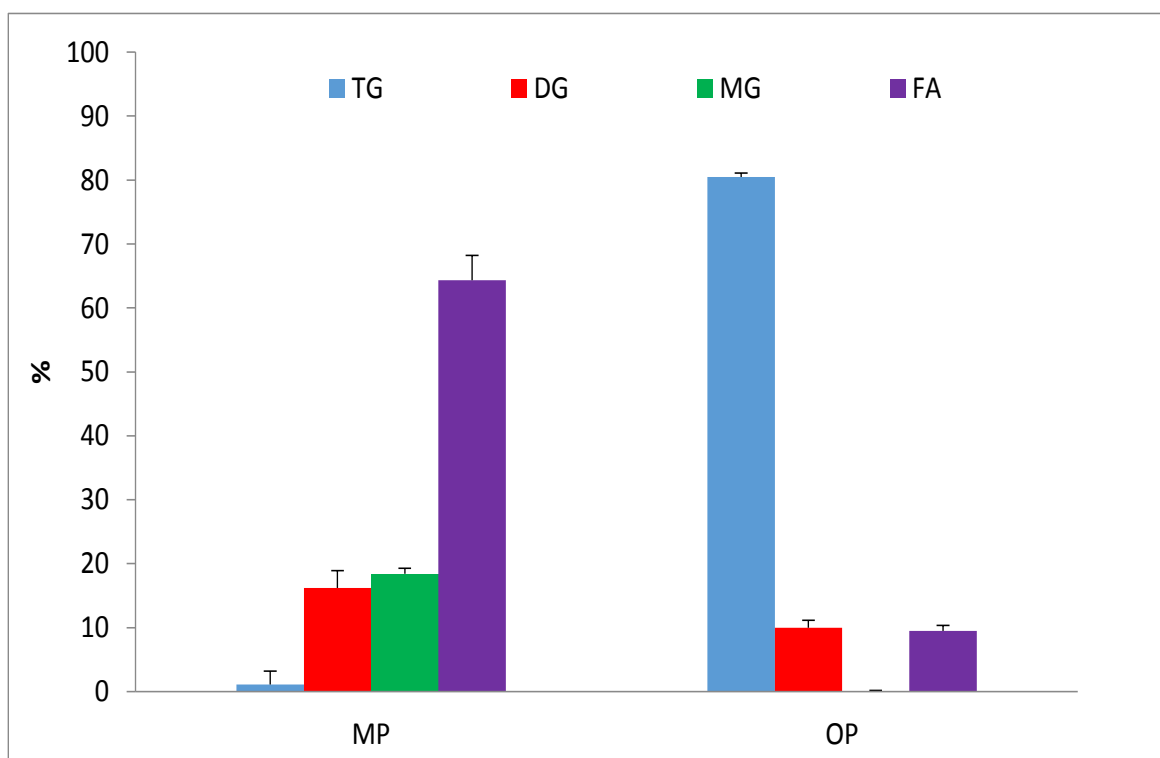


Figura 3. Composición lipídica de las fases MP y OP después de la digestión *in vitro* de aceite de oliva

En conclusión, se llegó a desarrollar un modelo de digestión intestinal *in vitro* capaz de reproducir resultados fisiológicos de la digestión de TG, tanto en grado y velocidad de hidrólisis, como bioaccesibilidad de los productos de digestión. Por tanto, este modelo se consideró adecuado para la evaluación del vehículo lipídico experimental propuesto (D-SCAKG) y su comparativa con la forma alternativa de vehículo, TB.

3.4.2. Digestión intestinal *in vitro* de alquilglicerol diesterificado

En la figura 4.A y 4.B se representa la evolución en el tiempo del proceso de digestión de ambas muestras lipídicas, D-SCAKG y TB, respectivamente, representándose tanto la desaparición de sustratos, como la generación de los distintos productos de hidrólisis. Los resultados indicaron que la lipasa pancreática era capaz de reconocer e hidrolizar ambos productos (figura 4. A y 4. B).

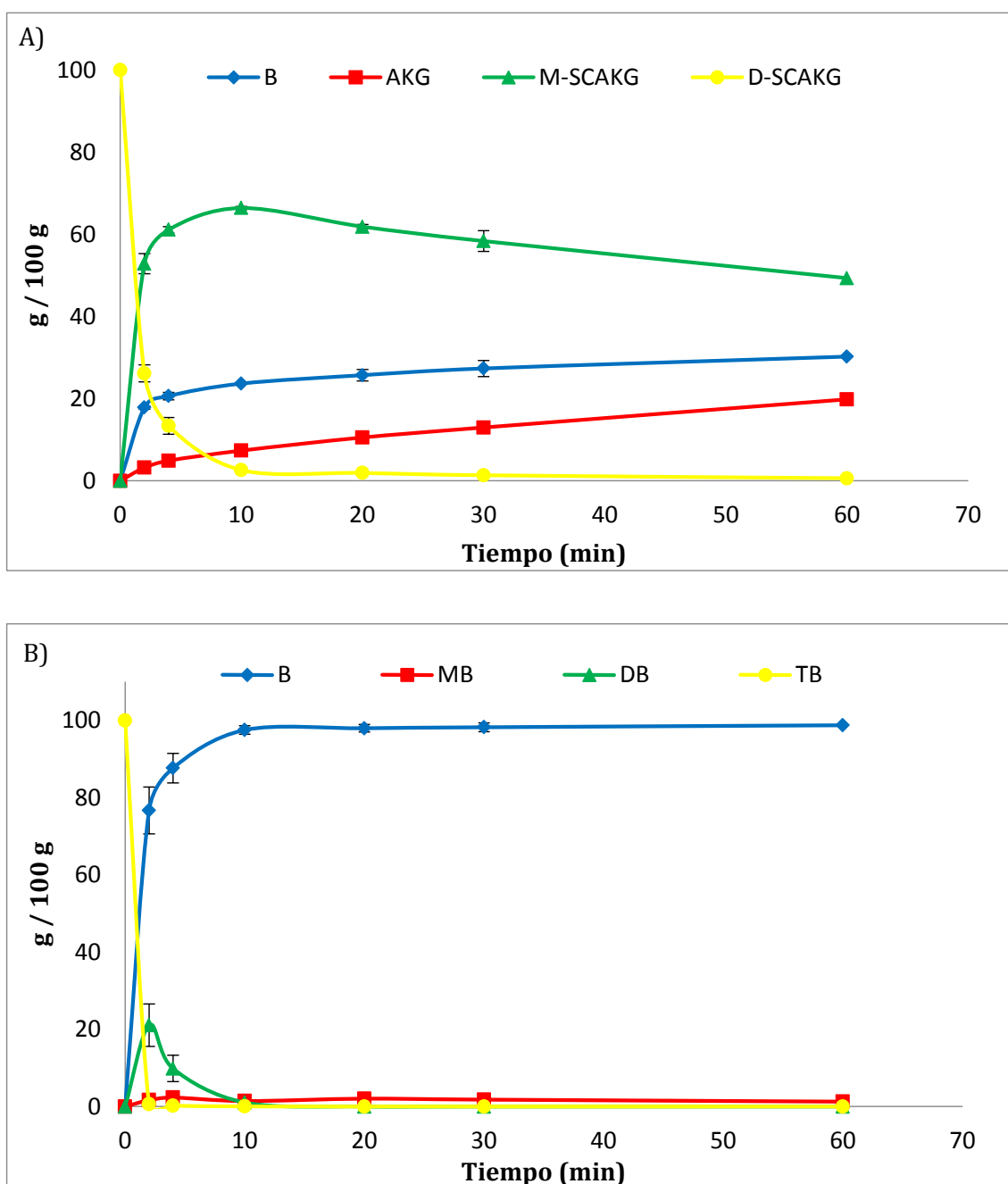


Figura 4: Evolución en el tiempo de los productos de digestión de A) D-SCAKG y B) TB

Sin embargo, se observaron diferencias en la velocidad de la digestión de ambos productos. La evolución de la reacción de hidrólisis fue más lenta en el caso del D-SCAKG que en el caso de la TB. Así, prácticamente en el inicio de la reacción (2 min) se había hidrolizado casi toda la TB, mientras que en el caso del D-SCAKG, y al mismo tiempo de reacción, la cantidad de producto hidrolizado era del 74% (figura 4.A y 4.B).

En cuanto al grado de hidrólisis, igualmente se observaron diferencias entre ambos compuestos. Después de 60 min de digestión, el D-SCAKG era hidrolizado, aunque sin llegar a alcanzar una hidrólisis completa, liberando como producto mayoritario de la digestión el 2- butiroil-1-*O*-octadecil-glicerol (M-SCAKG), el cual permaneció bastante estable durante toda la reacción de hidrólisis, seguido del ácido butírico libre y del 1-*O*-octadecil-glicerol (AKG) (figura 4.A). Por el contrario, la TB se hidrolizó completamente al cabo de 20 min de la digestión intestinal *in vitro*, degradándose completamente también sus productos intermedios de hidrólisis, dibutirina (DB) y monobutirina (MB); y detectándose únicamente en el medio de digestión la presencia del ácido butírico libre como producto final (figura 4.B).

En relación al producto mayoritario, el M-SCAKG y a su análogo en forma de MB, se observó que aunque el M-SCAKG era un producto bastante estable, este se fue degradando ligeramente tras alcanzar un máximo a los 10 min de digestión. Además, parece que esta hidrólisis del M-SCAKG no comenzó a observarse hasta que el D-SCAKG desapareció casi completamente (figura 4.A), mientras que en el caso de la MB, su hidrólisis sucedió de manera rápida, habiéndose hidrolizado prácticamente por completo desde el inicio de la digestión de la TB (figura 4.B).

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la estabilidad del producto M-SCAKG, se llevó a cabo una digestión intestinal *in vitro* del D-SCAKG a tiempos más largos de digestión, para poder evaluar la tendencia del M-SCAKG, observándose que aún se mantenía cerca de un 40 % de M-SCAKG a 240 min de reacción. Este resultado confirmó que el M-SCAKG era bastante estable a lo largo de la digestión intestinal.

Es importante señalar que existe poca información acerca de la hidrólisis de los alquilgliceroles catalizada por la lipasa pancreática, pero se ha visto en otros

estudios, que la tasa de hidrólisis en alquilglicerol esterificados con FA de cadena larga PUFAs fue menor en comparación con sus análogos en forma de TG (26), resultado similar al que se ha observado en el presente trabajo con las mismas estructuras lipídicas (SCAKG y TG) esterificadas con FA de cadena corta.

Por otro lado, miembros del grupo de investigación IAF-UAM han llevado a cabo un estudio sobre la reacción de etanolisis catalizada por lipasas del mismo D-SCAKG utilizado en el presente trabajo, y su comparativa con TB (27). En dicho trabajo, a pesar de que la reacción fue llevada a cabo en un medio no acuoso y más simple, bastante diferente del medio acuoso complejo utilizado en este estudio, los autores encontraron diferencias en la evolución de la hidrólisis del D-SCAKG y de la TB similares a las que se observaron en el presente estudio. En dicho trabajo se indicó que la tasa de etanolisis del D-SCAKG fue menor que la de la TB, siendo además la etanolisis de la TB más completa. Además, el M-SCAKG fue el producto mayoritario de la etanolisis de los D-SCAKG, manteniéndose en unos niveles constantes durante el transcurso de la reacción, de acuerdo con los resultados observados en el presente trabajo.

En cuanto a la evolución de la digestión intestinal *in vitro* de la TB, esta siguió el proceso clásico de digestión gastrointestinal de TG de cadena corta descrito en la bibliografía (28), donde otros autores han observado que este tipo de compuestos lipídicos son hidrolizados rápidamente y de manera completa a FFA y glicéridos por las lipasas digestivas (28, 29). La hidrólisis completa de los TG de cadena corta se ha explicado en algunos estudios mediante fenómenos de acil-migración (30), que implica el cambio de los ácidos grasos de la posición *sn*-2 a *sn*-1(3). Este fenómeno se ve más favorecido en el caso de SCFA. Esto supondría que los productos 1,2-DG y 2-MG formados durante la hidrólisis de los TG, tienden a migrar rápidamente a las posiciones *sn*-1,3 del glicerol, dando lugar a la formación de 1,3-DG y 1-MG, los cuales son sustrato de las enzimas digestivas *sn*-1,3 específicas, por lo que tendría lugar una hidrólisis completa, con la liberación de FFA y glicerol como productos finales de digestión (30).

En base a lo que se acaba de comentar, en el caso del M-SCAKG, su lenta pero progresiva disminución a partir de los 10 min de digestión (figura 4.A) podría

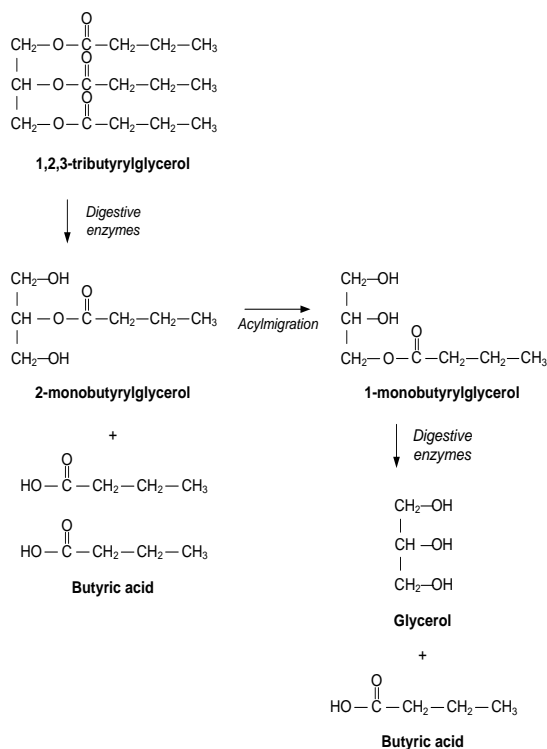
sugerir que también se está produciendo cierto grado de acil-migración del ácido butírico esterificado en la posición *sn*-2 a la posición *sn*-3. Sin embargo, dado que solo existe una posible posición para la migración en M-SCAKG, esta se habría producido de manera más lenta a como estaría sucediendo en el caso de la MB, que presenta 2 posibles posiciones para la migración (*sn*-1 y *sn*-3).

Estas diferencias observadas entre el M-SCAKG y la MB durante la digestión intestinal de ambos productos podrían deberse principalmente a la estructura del esqueleto de los alquilglicerol; en donde la posición *sn*-1 de la glicerina contiene un enlace éter con un alcohol octadecilo, por lo que la única posición libre que tiene la molécula de alquilglicerol, para que tengan lugar los fenómenos de acil-migración del ácido butírico, sería la *sn*-3.

En base al razonamiento explicado, con el fin de detallar cómo sucedería el proceso de hidrólisis de los D-SCAKG, y comparándolo con el proceso de hidrólisis normal de la TB, en la figura 5 se representa un esquema teórico de cómo sería la evolución del proceso de digestión de ambos compuestos teniendo en cuenta el fenómeno de acil-migración.

Otra razón que podría explicar las diferencias observadas en la evolución de la hidrólisis de ambos productos podría estar relacionada con la propia cadena eterificada de los D-SCAKG que consiste en una cadena alquílica saturada de 18 átomos de carbono. Esta particular estructura podría influir en la interacción de la enzima con el D-SCAKG, y explicar la diferente evolución de la reacción con respecto a la TB (24, 27).

a) TB



b) D-SCAKG

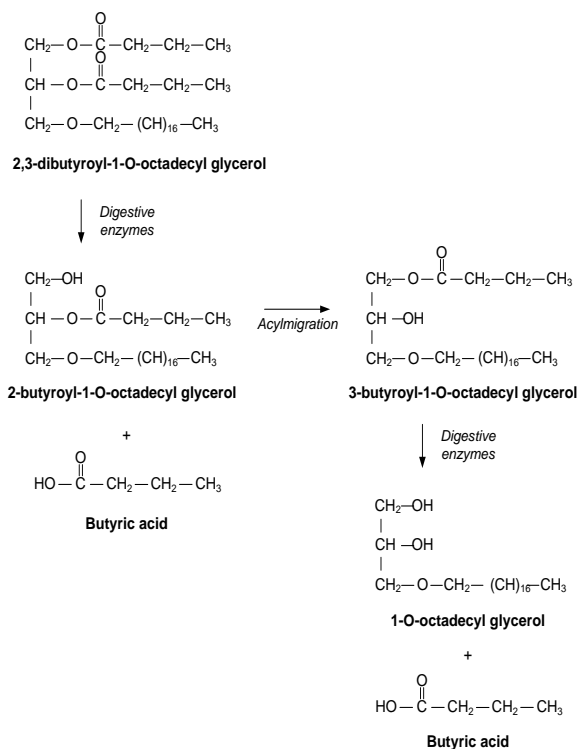


Figura 5: Representación teórica de la reacción de hidrólisis los triradilgliceroles con ácido

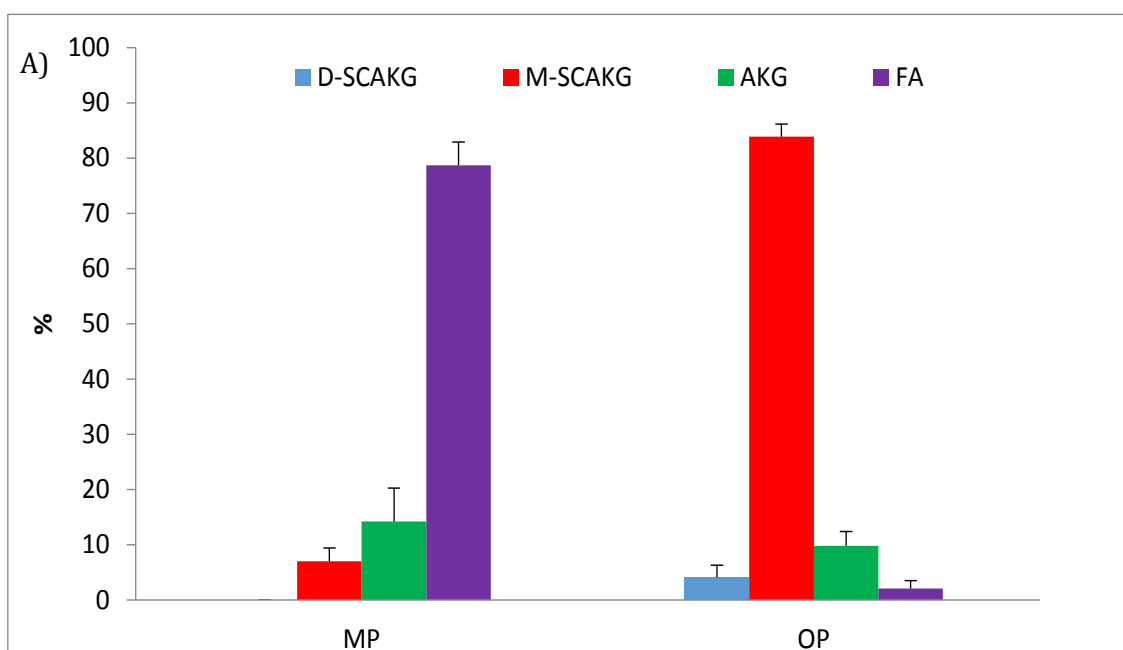
Es importante destacar que las diferencias observadas en el presente estudio entre el D-SCAKG y la TB, en cuanto a la velocidad de la hidrólisis y el grado de liberación de los productos lipídicos, presenta implicaciones interesantes. Como ya se comentó al inicio del presente trabajo, uno de los principales problemas de la aplicación del ácido butírico como un agente antitumoral es la limitación de poder alcanzar una concentración en plasma suficiente para que presente efectos antiproliferativos y de diferenciación celular (3, 6). En este sentido, existen estudios que han conseguido alcanzar cierto nivel de ácido butírico en los tejidos periféricos tras su administración en forma de TB (31, 32), pero estos estudios continuaban presentando la problemática de no poder mantener el butirato en sangre durante el tiempo necesario para llevar a cabo su función bioactiva (32). Coradini et al (1) afirmaron que para poder obtener un pro-fármaco eficiente de butirato es necesario que presente un enlace suficientemente estable entre la molécula con la cual se quiere vehiculizar el compuesto, para poder aumentar su vida media en el torrente sanguíneo y poder llegar a los tejidos periféricos sobre

los cuales llevar a cabo su efecto bioactivo. Por este motivo, los resultados del ensayo experimental llevado a cabo con el D-SCAKG en este trabajo señalaron a este compuesto como un potencial vehículo de butirato de interés, ya que se libera como producto mayoritario durante la reacción el M-SCAKG, un producto lipídico que presentaría un enlace bastante estable con el butírico en posición *sn*-2, a diferencia del vehículo análogo en forma de TB, que resultó hidrolizado completamente.

Por otro lado, es importante señalar que el propio AKG sin esterificar se liberó como tercer producto mayoritario de la digestión del D-SCAKG, siendo otra posible vía de aprovechamiento de la bioactividad de estos compuestos. El AKG fue aumentando progresivamente durante la hidrólisis, alcanzando valores próximos al 20 % a los 60 min y superiores al 30 % a tiempos más largos de digestión (240 min).

3.4.3. Bioaccesibilidad de alquilglicerol diesterificado

Una vez evaluadas la velocidad y el grado de hidrólisis del D-SCAKG y de la TB, se estudió la bioaccesibilidad de los productos de hidrólisis de cada uno de los dos sustratos de estudio. En la figura 6 se representan los resultados de la composición lipídica de cada una de las fases del medio de digestión, MP y OP. La PP en ambos estudio fue minoritaria, por lo que no se representó en la figura 6.



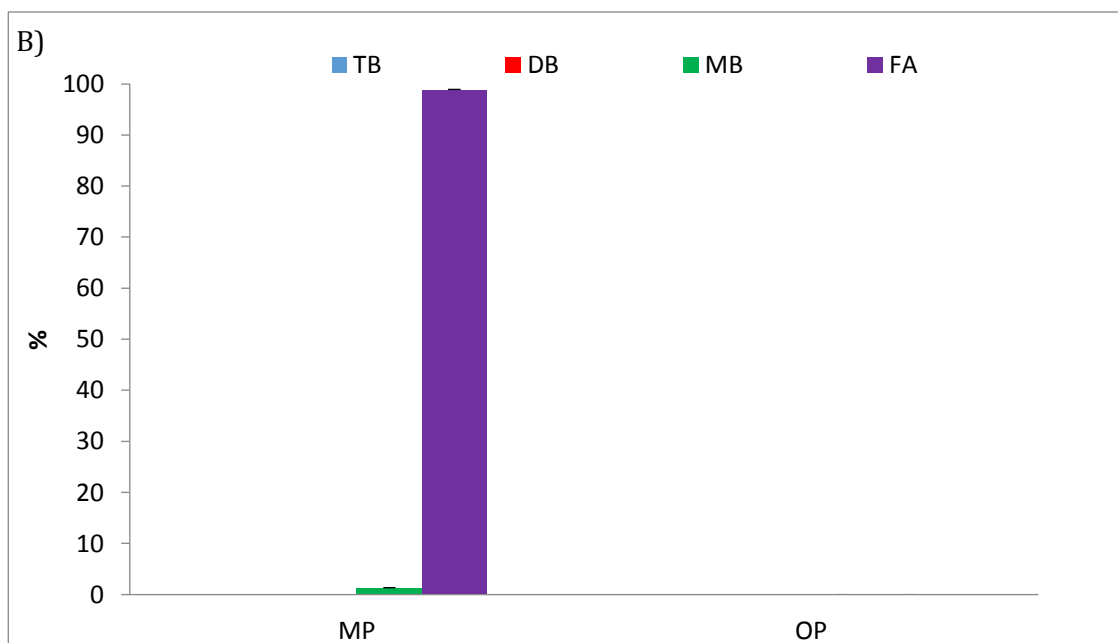


Figura 6: Composición lipídica de las MP y OP después de la digestión intestinal *in vitro* de, A) D-SCAKG y B) TB

Aproximadamente el 40% del total de los lípidos liberados de la hidrólisis del D-SCAKG se encontraban en la MP, la cual estaba formada principalmente por ácido butírico y pequeñas cantidades de M-SCAKG y AKG. El 60% restante de los lípidos se encontraban en la OP, la cual estaba principalmente formada por M-SCAKG. También se observó que el AKG se encontraba repartido entre ambas fases en proporciones similares.

Por el contrario, en el caso de la TB, la totalidad de los componentes lipídicos se encontraban en la MP, no observándose OP al final de la digestión intestinal *in vitro*. A diferencia de lo que se observó con el D-SCAKG, la TB fue totalmente hidrolizada a ácido butírico, por lo que este fue el principal componente de la MP, acompañado de una cantidad muy pequeña de glicéridos procedentes de su hidrólisis, principalmente en forma de MB.

Es importante destacar el hecho de que el producto mayoritario de la hidrólisis del D-SCAKG, el M-SCAKG, se encontraba principalmente en la OP del medio de digestión (figura 6.A), lo que indicaría cierta limitación en su bioaccesibilidad. Este resultado podría ser explicado por una baja solubilidad de esta molécula en las estructuras micelares, relacionada con el alcohol octadecilo

eterificado en el alquilglicerol. Se ha descrito en la bibliografía que los FA saturados de cadena larga, tanto libres como en forma de MG, son pobremente absorbidos debido a su baja solubilidad en las estructuras micelares y a su fuerte tendencia a formar jabones de calcio insolubles a pH alcalino (33). Esta difícil solubilización micelar del alquilglicerol eterificado con una cadena alquílica saturada podría ser la causa de su mayor distribución en la OP. No obstante, ante esta situación, hay que tener en cuenta que se ha observado que la absorción de los lípidos insolubles puede aumentar cuando coexisten en el medio intestinal con FA más insaturados (34). Esto puede ser debido a que la inclusión en la MP se vería mejorada gracias a una mayor expansión de las micelas por la fácil incorporación en las mismas del MG y el FA insaturado (34). En el presente trabajo se buscó evaluar si esta hipótesis descrita tendría lugar o no en el caso del D-SCAKG. Para ello se llevó a cabo una digestión intestinal *in vitro* adicional del D-SCAKG, pero acompañándolo en el medio de aceite de oliva, como fuente lipídica más insaturada.

Observando los resultados obtenidos en el presente ensayo (figura 7), se comprobó que la adición de un lípido de acompañamiento en forma de TG insaturado favorecería la inclusión del M-SCAKG en las micelas, mejorando su bioaccesibilidad.

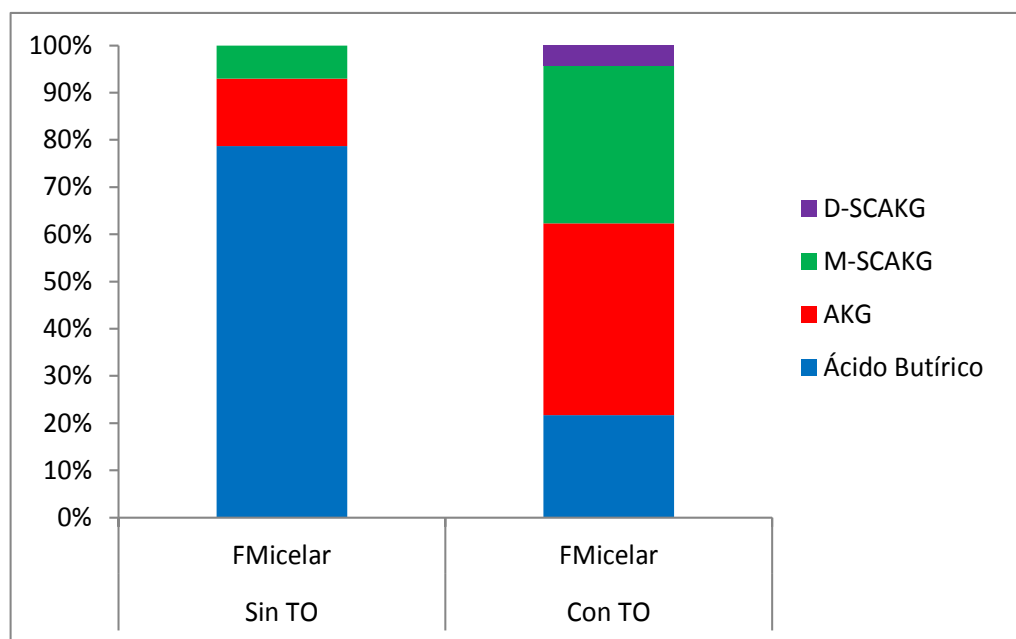


Figura 7. Reparto del total de productos de digestión de D-SCAKG la MP en ausencia y en presencia de aceite de oliva (TO). En la figura no se incluyen los productos de hidrólisis del aceite de oliva

3.4.4. Actividad antiproliferativa de alquilglicerol diesterificado digerido en células de cáncer de colon

Hay que tener en cuenta que en base a los resultados que se acaban de exponer en los apartados anteriores, el D-SCAKG sería reconocido por las enzimas digestivas tras una administración oral, dando lugar a los productos M-SCAKG, ácido butírico y AKG. Por lo tanto, es razonable pensar que el conjunto de estos productos de digestión serían los que tendrían mayor probabilidad de ejercer un efecto bioactivo sobre las células intestinales, en lugar del D-SCAKG intacto. Así, con el fin de evaluar la relevancia de estos productos de digestión, se planteó un estudio comparativo de la actividad anticarcinogénica en una línea tumoral de células de colon del D-SCAKG sin digerir y digerido. A su vez, se evaluó la actividad antiproliferativa de cada uno de los productos de hidrólisis (M-SCAKG, AGK, ácido butírico) de manera individual, con fines comparativos.

Por otro lado, a la hora de evaluar el efecto bioactivo de cualquier estructura lipídica, es fundamental considerar la relevancia que tiene la inclusión de los productos de digestión en estructuras micelares para facilitar su acceso a las células intestinal, tal y como se explicó en el Capítulo I. Por lo tanto, en el presente ensayo se pretende a su vez evaluar el impacto que tendría dicho efecto de micelización sobre la bioactividad del D-SCAKG, tanto digerido como sin digerir.

En la figura 8 se representan los resultados del efecto antiproliferativo de cada uno de los productos lipídicos individuales adicionados a las células tumorales, tanto sin micelar, como vehiculizados a través de micelas.

En cuanto a los resultados de la adición sin micelar de cada uno de los productos a las células tumorales de colon, se observó que el D-SCAKG y el M-SCAKG no presentaban actividad antiproliferativa, a diferencia del AKG y del ácido butírico, los cuáles sí mostraban tener un cierto efecto antiproliferativo. Concretamente se observó que el AKG fue el compuesto que presentó una mayor actividad antiproliferativa. Estos resultados fueron similares a los que se habían observado en otros estudios previos de la bibliografía, realizados con otros AKG, o con ácido butírico como potenciales pro-fármacos (35, 36).

Sin embargo, se observó que el D-SCAKG y el M-SCAKG mostraron actividad antiproliferativa cuando fueron vehiculizados en forma de micelas (figura 8). Además, se observó nuevamente que el producto con mayor actividad antiproliferativa era el AKG, el cuál presentaba también una actividad mejorada al ser vehiculizado mediante las micelas, en comparación con el mismo sin micelar (figura 8). Es importante destacar que para el ácido butírico no se llevo a cabo el ensayo de inclusión en las micelas con el fin de simular una situación real, debido a que al tratarse de un FA de cadena corta, no necesita incluirse en las micelas para poder ser absorbido por los enterocitos a nivel intestinal, tal y como se detalló en el Capítulo I.

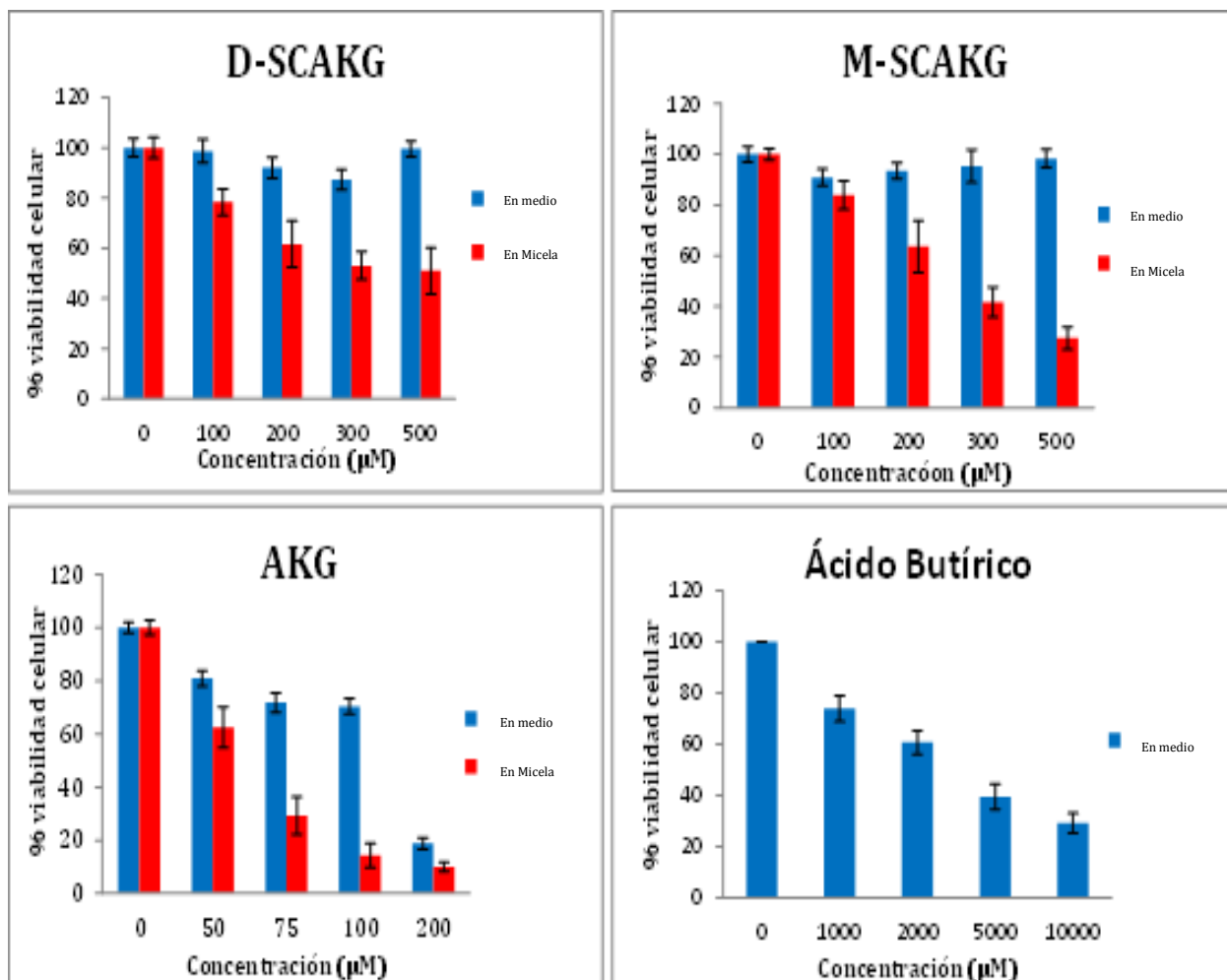


Figura 8. Efecto antiproliferativo de los diferentes componentes lipídicos de la digestión de manera libre y vehiculizados mediante micelas.

Una evaluación más completa de la actividad antiproliferativa de estos compuestos en la inhibición del crecimiento y la promoción de la muerte celular se detalla en la Tabla 2, donde se muestran los valores calculados de IC50, GI50, TGI y LC50 en las condiciones en las que se observaron que presentaban un efecto bioactivo.

	D-SCAKG				M-SCAKG				AKG				ÁC. BUTÍRICO			
	Micelas				Micelas				Medio				Micelas			
	Con(uM)		s.e.m.		Con(uM)		s.e.m.		Con(uM)		s.e.m.		Con(uM)		s.e.m.	
IC50	282,02	±	65,62		237,04	±	44,46		101,87	±	7,80		48,73	±	7,16	
GI50	150,52	±	28,89		178,79	±	31,58		64,13	±	1,84		26,94	±	6,94	
TGI	385,28	±	31,15		395,09	±	34,06		116,04	±	20,30		65,38	±	14,74	
LC50					732,76	±	20,93		130,56	±	25,57		85,90	±	23,14	

Tabla 2: Parámetros de IC50, GI50, TGI y LC50 de D-SCAKG, M-SCAKG, AKG y ácido butírico.

* IC50 (concentración que inhibe el 50% de viabilidad celular), GI50 (concentración que inhibe el 50% de crecimiento), TGI (concentración que inhibe el total de crecimiento) y LC50 (concentración que produce el 50% de muerte celular).

En definitiva, los resultados del presente ensayo indicaron que los alquilgliceroles no esterificados (AKG) presentaban una mayor actividad antiproliferativa en las células de cáncer de colon que los alquilgliceroles esterificados (M-SCAKG y D-SCAKG). Además, se pudo observar que la inclusión de estos productos en micelas mixtas mejoraba esta actividad antiproliferativa en todos los casos.

En la figura 9 se representa la comparativa de la bioactividad del D-SCAKG sin digerir y del mismo compuesto digerido (mezcla de productos de digestión) adicionados a los cultivos celulares a través de micelas. Tal y como se puede observar, el D-SCAKG digerido fue del orden de 4 veces más efectivo que el D-SCAKG sin digerir. Este resultado sugiere la importancia de que tenga lugar previamente el proceso fisiológico de digestión del D-SCAKG para que se pueda producir su efecto bioactivo.

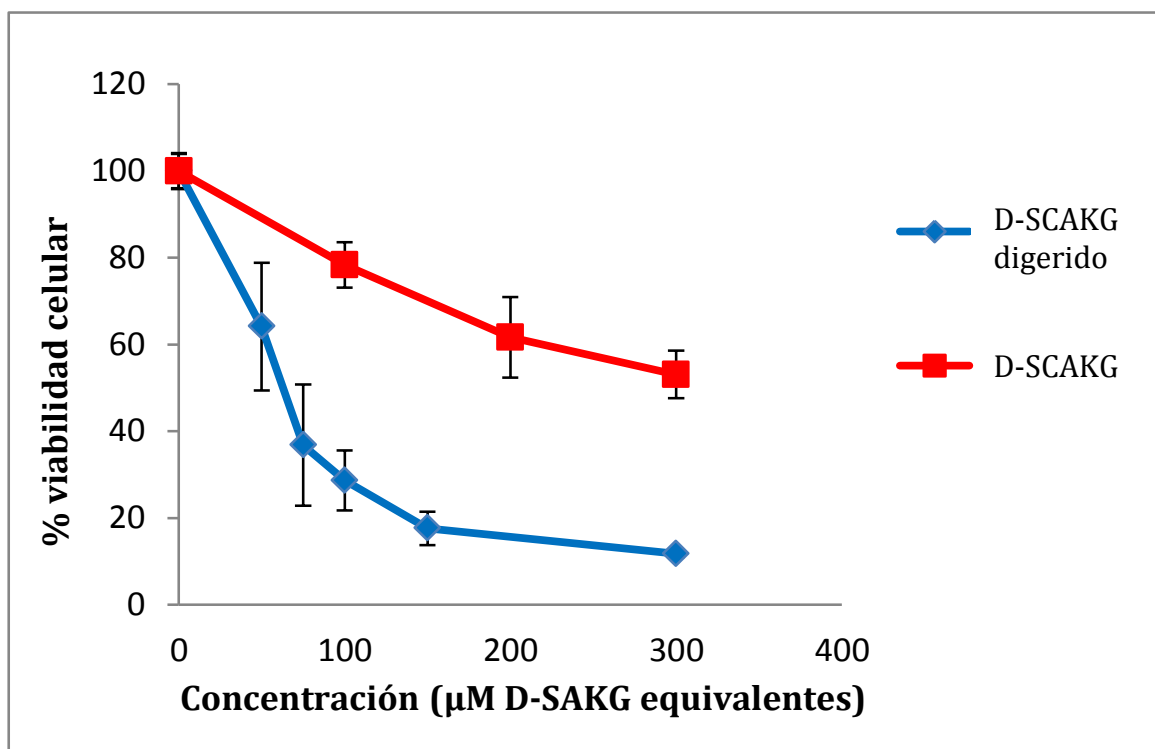


Figura 9. Efecto antiproliferativo del D-SCAKG digerido y sin digerir

De la misma manera que se hizo para la evaluación de la actividad antiproliferativa de cada uno de los componentes lipídicos por separado, los valores IC₅₀, GI₅₀, TGI y LC₅₀ del D-SCAKG sin digerir y digerido se detallan en la Tabla 3.

Digested D-SAKG (in micelles)				D-SCAKG (in micelles)	
	(uM D-AKG equivalent)		s.e.m.	Conc. (uM)	s.e.m.
IC ₅₀	74,0	±	13,7	282,02	± 65,26
GI ₅₀	50,8	±	12,0	150,52	± 28,89
TGI	79,8	±	15,4	385,28	± 31,15
LC ₅₀	85,2	±	9,7	no data	±

Tabla 3: Parámetros de IC₅₀, GI₅₀, TGI y LC₅₀ de D-SCAKG digerido y sin digerir

Nota: "D-SCAKG equivalent" son equivalentes molares de D-SCAKG estimados a partir de la composición de la mezcla de productos de digestión

Finalmente, se llevó a cabo un estudio comparativo sobre el efecto de interacción entre los distintos productos liberados de la hidrólisis del D-SCAKG que presentaron un alto efecto antiproliferativo en los ensayos anteriores (M-SCAKG y AKG), y se excluyeron por tanto el ácido butírico y el D-SCAKG por su bajo efecto antiproliferativo. Se añadieron los productos en las proporción en las que se encontraban en el medio de digestión después de la hidrólisis del D-SCAKG y se vehiculizaron a través de micelas. Como se puede observar en la figura 10, la combinación de M-SCAKG y AKG mostró los mismos resultados que la combinación completa de todos los productos de la digestión. Este resultado podría sugerir que los productos bioactivos de la digestión del D-SCAKG serían sus productos mayoritarios de hidrólisis, M-SCAKG y AKG.

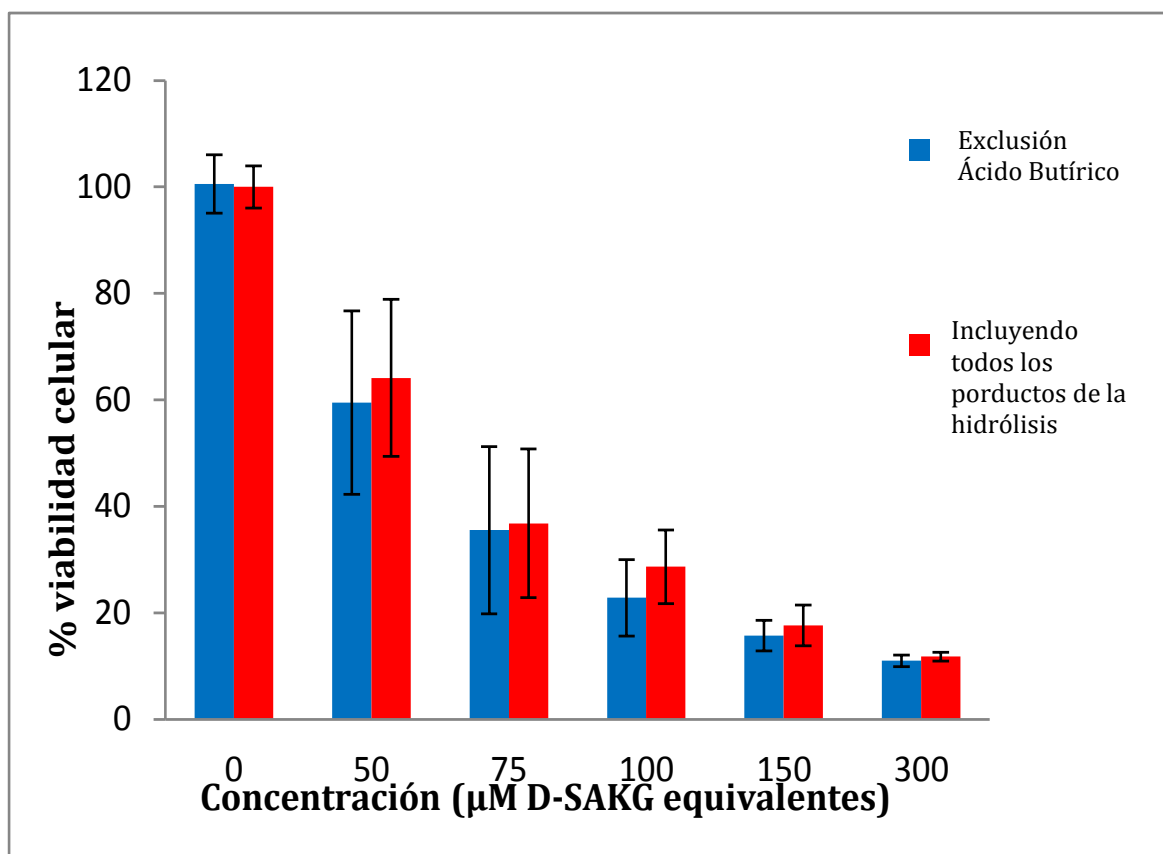


Figura 10. Comparación de efecto antiproliferativo de los productos liberados de la hidrólisis del D-SCAKG, incluyendo y excluyendo al ácido butírico.

3.5. CONCLUSIONES

Se desarrolló un modelo de digestión intestinal *in vitro* que reprodujo resultados fisiológicos comparables a los descritos *in vivo* para el caso particular de lípidos habituales de la dieta en forma de TG.

La aplicación del modelo de digestión *in vitro* desarrollado en la evaluación del D-SCAKG permitió concluir que este podría ser propuesto como un potencial vehículo de ácido butírico, debido a que su hidrólisis a nivel intestinal liberaría una forma esterificada estable de ácido butírico en forma de M-SCAKG; al contrario que su análogo, en forma de TG, la TB, el cual es completamente hidrolizado a ácido butírico. Adicionalmente, dicho vehículo lipídico, así como su producto mayoritario de digestión, combinarían en una misma molécula dos potenciales componentes bioactivos, por un lado el alquilglicerol y por el otro lado el ácido butírico.

Además, los productos de la hidrólisis del D-SCAKG serían potencialmente bioaccesibles, especialmente en coexistencia con otros lípidos de la dieta habituales.

Por otro lado, es importante señalar que el D-SCAKG pareció ser un lípido antitumoral de gran interés, mostrando una buena actividad antiproliferativa en células intestinales, pero sólo después de su digestión intestinal, de su solubilización en micelas mixtas, y como consecuencia del efecto fundamental de los dos productos mayoritarios de la digestión, el M-SCAKG y el AKG.

3.6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Coradini, D., Pellizzaro, C., Miglierini, G., Daidone, M., Perbellini, A. (1999). Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: improvement of the anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line. *Int J Cancer*, 81 , 411-416.
- (2) Avivi-Green, C., Polak-Charcon, S., Madar, Z., Schwartz, B. (2000). Apoptosis cascade proteins are regulated in vivo by high intracolonic butyrate concentration: correlation with colon cancer inhibition. *Oncol Res*, 12 , 83-95.

- (3) Kuroiwa-Trzmielina, J., de Conti, A., Scolastici, C., Pereira, D., Horst, M., Purgatto, E., et al. (2009). Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. *Int J Cancer*, 124 , 2520-2527.
- (4) Kuefer, R., Hofer, M., Altug, V., Zorn, C., Genze, F., Kunzi-Rapp, K., et al. (2004). Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 90 , 535-541.
- (5) Ooi CC, Good NM, Williams DB, Lewanowitsch T, Cosgrove LJ, Lockett TJ, Head RJ (2010) Efficacy of butyrate analogues in HT-29 cancer cells, *Clin Exper Pharm Physiol* 37, 482-489.
- (6) Li, Y., Le Maux, S., Xiao, H., McClements, D. (2009). Emulsion-based delivery systems for tributyrin, a potential colon cancer preventive agent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 , 9243-9249.
- (7) Clarke, J., Bird, T., Topping, D., Young, G., Cobiac, L. (2006). Effect of resistant starch, butyrylated starch and tributyrin on colon cancer in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 , A270-A270.
- (8) Torres, C., Vazquez, L., Senorans, F., Reglero, G. (2009). Enzymatic synthesis of short-chain diacylated alkylglycerols: a kinetic study. *Process biochemistry*, 44 , 1025-1031.
- (9) Pedrono F, Saiag B, Moulinoux JP, Legrand AB (2007). 1-O-alkylglycerols reduce the stimulating effects of bFGF on endothelial cell proliferation *in vitro*. *Cancer Lett* 251, 317-322.
- (10) McIntyre, T., Snyder, F., Marathe, G. (2008). Ether-linked lipids and their bioactive species. In D. Vance, & J. Vance, *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes (5th Edn.)* (pp. 245-276). Amsterdam: Elsevier

- (11) Farooqui, A., Farooqui, T., Horrocks, L. (2008). In A. Farooqui, T. Farooqui, & L. Horrocks, *Metabolism and function of bioactive ether lipids in the brain* (pp. 1-16). New York: Springer.
- (12) Bams-Mengerink AM, Brites P, Vyth A, Duran M, Wanders RJA, Heymans HAS, Poll-The BT (2008) Batyl alcohol as a therapeutic option in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J. Inherited Met Dis* 31, 68-68
- (13) Endo, Y., Chiba, T., Fujimoto, K. (1996). Oxidative and hydrolytic stability of synthetic diacyl glyceryl ether. *Biosci Biotech Biochem*, 60, 216-219.
- (14) Christensen, M., Hoy, C., Becker, C., Redgrave, T. (1995). Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA) and decanoic acid: dependence on intramolecular triacylglycerol structure. *Am J Clin Nutr*, 61 , 56
- (15) Das, A., Holmes, R., Wilson, G., Hajra, A. (1992). Dietary ether lipid incorporation into tissue plasmalogens of humans and rodents. *Lipids*, 27 , 401-405.
- (16) Martin D, Nieto-Fuentes JA, Señorans FJ, Reglero G, Soler-Rivas C. (2010) In vitro digestion of fish oil and ω 3-concentrates as triacylglycerols and ethyl esters. *Eur J Lipid Sci Technol* 112, 1315-1322
- (17) Hofmann, A., Borgstrom, B. (1964) The intraluminal phase of fat digestion in man: the lipid content of the micellar and oil phases of intestinal content obtained during fat digestion and absorption. *Journal of Clinical Investigation*, 43 , 247-257.
- (18) Soler-Rivas, C., Marin, F., Santoyo, S., Garcia-Risco, M., Senorans, F., Reglero, G. (2010). Testing and enhancing the in vitro bioaccessibility and bioavailability of *Rosmarinus officinalis* extracts with a high level of antioxidant abietanes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 , 1144-1152.

(19) Fatouros, D., Bergenstahl, B., Mullertz, A. (2007). Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during *in vitro* digestion. *Eur J Pharm Sci*, 31 , 85-94.

(20) Torres, C., Vazquez, L., Senorans, F., Reglero, G. (2005). Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector. *J Chromatogr A*. 2005, 1078, 28-34.

(21) Torres, C., Tenllado, D., Senorans, F., Reglero, G. (2009). A versatile GC method for the analysis of alkylglycerols and other neutral lipid classes. *Chromatographia*, 69, 729-734.

(22) Porter, C., Charman, W. (2001). *In vitro* assessment of oral lipid based formulations. *Advanced drug delivery reviews*, 50 , s127-s147

(23) Porter C, Kaukonen AM, Taillardat-Bertschinger A, Boyd BJ, O'Connor JM, Edwards GA, Charman WN (2004) Use of *in vitro* lipid digestion data to explain the *in vivo* performance of triglyceride-based oral lipid formulations of poorly water-soluble drugs: Studies with halofantrine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93 (5), 1110-1121

(24) Fernandez-Garcia E, Carvajal-Lerida I, Perez-Galvez A (2009) *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research* 29, 751-760

(25) Diana Martin, Juan A. Nieto-Fuentes, Francisco J. Senorans, Guillermo Reglero and Cristina Soler-Rivas (2010) Intestinal digestion of fish oils and v-3 concentrates under *in vitro* conditions *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 1315–1322

(26) Tsuzuki, W., Ue, A., Nagao, A., Akasaka, K. (2002). Fluorometric analysis of lipase hydrolysis of intermediate- and long-chain glycerides. *The analyst*, 127 , 127.

(27) Vazquez, L., Fernandez, O., Blanco, R., Senorans, F., Reglero, G., & Torres, C. (2010). A kinetic study of the lipase-catalyzed ethanolysis of two short-chain triacylglycerols: alkylglycerols vs triacylglycerols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64 , 101-106.

- (28) Takeuchi, H., Sekine, S., Kojima, K., Aoyama, T. (2008). The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. *Asia Pac J Clin Nutr*, 17 , 320-323.
- (29) Wachtershauser, A., Stein, J. (2000). Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur J Nutr*, 39 , 164-171.
- (30) Howard, J., Jackson, M., Smyth, D. (1970). Intracellular hydrolysis of short chain glycerides by rat small intestine in vitro and transfer of glycerol. *Journal of Physiology*, 208 , 461-471.
- (31) Conley, B., Egorin, M., Tait, N., Rosen, M., Sausville, E., Dover, G., et al. (1998). Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors. *Clin Canc Res*, 4 , 629-634.
- (32) Newmark, H., Lupton, J., Young, C. (1994). Butyrate as a differentiating agent. pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer Lett*, 78 , 1-5.
- (33) Yan Li and David Julian McClements, (2010) New Mathematical Model for Interpreting pH-Stat Digestion Profiles: Impact of Lipid Droplet Characteristics on in Vitro Digestibility, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8085-8092
- (34) Dawson A (1971) The absorption of fat. *Journal of Clinical Pathology*, 224, 77-84
- (35) Reynolds S., Cederberg H., Chakrabarty S., (2000) Inhibitory effect of 1-O (2 methoxy) hexadecyl glycerol and phenylbutyrate on the malignant properties of human prostate cancer cells, *Clin Exp Metastasis* 18 309-312.
- (36) Wächtershäuser A., Stein J., (2000) Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases, *Eur J Nutr* 39 164-171.

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV: “APLICACIÓN DE UN MODELO DE DIGESTIÓN INTESTINAL *IN VITRO* DE ACILGLICEROLAS EN EL ESTUDIO COMPARATIVO DE ACEITES RICOS EN 1,3-DIGLICÉRIDOS, 1-MONOGLICÉRIDOS O SUS MEZCLAS.”

Publicado en: *Food Research International*, 64, 603-609. 2014

4.1. INTRODUCCIÓN

Tal y como se comentó en el Capítulo I, en los últimos años se está prestando especial interés a formas lipídicas de la familia de los glicéridos parciales, principalmente DG y MG, debido a diversas razones (1- 3) entre las cuales destaca la función tecnológica que presentan estos compuestos lipídicos, relacionada con su naturaleza anfifílica y con sus propiedades surfactantes.

Uno de los usos más reciente que se ha visto que presentan algunos glicéridos parciales es su capacidad para dar lugar a vehículos lipídicos capaces de transportar de manera física (en forma de emulsiones, microemulsiones, nanoemulsiones) tanto fármacos como compuestos bioactivos de poca solubilidad, facilitando su bioaccesibilidad a nivel intestinal, protegiéndolos de la degradación gastrointestinal que sufren tras su ingesta y ayudando así a la mejora de su efecto bioactivo (4). Otra característica de especial interés, y que es importante mencionar sobre los glicéridos parciales, es su importancia como potenciales precursores en la producción de diversos lípidos estructurados (2, 5).

Además de todas las características anteriormente mencionadas, uno de los principales motivos por los cuáles los glicéridos parciales están mostrando un especial interés en los últimos años es la propia bioactividad que presentan algunas formas específicas, concretamente las formas lipídicas 1,3-DG y 1(3)-MG con función hipocalórica (6- 12).

Aunque el efecto bioactivo de estos productos no está claramente establecido, la principal hipótesis que se ha utilizado estaría relacionada con el metabolismo de estos glicéridos parciales en los enterocitos diferente al de TG habituales. Los productos lipídicos habituales de la digestión de TG (FFA y 2-MG) son absorbidos por los enterocitos, y una vez que se encuentran dentro de los mismos, son re-esterificados en forma de TG a través de la vía del 2-MG, catalizada por la 2-MG aciltransferasa específica. El nuevo TG re-esterificado será incluido en quilomicrones para su transporte sistémico por el organismo (figura 1). Por el contrario, en la hidrólisis intestinal de las formas 1,3-DG por la lipasa pancreática *sn*-1(3) específica se liberan FFA, 1(3)-MG o glicerol si la hidrólisis es completa. En el interior de los enterocitos, el 1(3)-MG o el glicerol no serán fácilmente reconocidos como sustratos por la aciltransferasa, por lo que se desviarán por una ruta metabólica alternativa, la ruta de la glicerol-3-fosfato, la cual es menos eficiente a la hora de re-esterificar TG (figura 1) (13), lo que dará lugar a la formación de un menor número de quilomicrones, acompañados de un aumento de la β -oxidación de los FA (7, 9, 11, 14- 17).

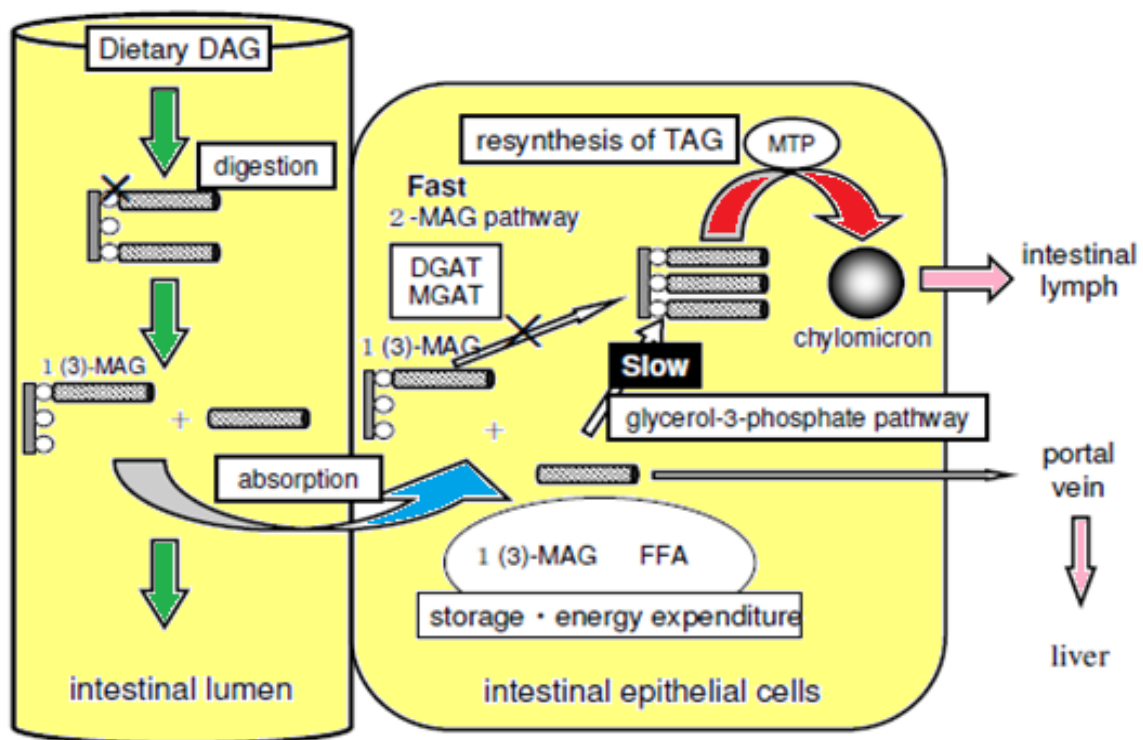


Figura 1. Esquema de las rutas metabólicas de 1-MG y 2-MG en el interior de los enterocitos (13)

En relación a la forma específica 1(3)-MG, además de la peculiaridad sobre su metabolismo intestinal, se han descrito otras bioactividades de interés para esta forma lipídica como son, actividad antimicrobiana (18), actividad antioxidante y actividad anti-aterosclerótica (19). Además, se ha observado que el MG es un potencial inhibidor del incremento post-prandial de la insulina en sangre en ratones (20).

Por tanto, debido a todas estas características, los glicéridos parciales como el 1,3-DG o el 1(3)-MG podrían presentar un gran interés en el diseño de formulaciones alimentarias, gracias a la doble ventaja de vehicular físicamente compuestos bioactivos, aportando a su vez al propio vehículo glicérido su bioactividad.

De acuerdo con el importante papel que desempeñan los glicéridos parciales en la formación de emulsiones de los lípidos a nivel intestinal, al igual que el importante papel de su bioactividad a nivel del metabolismo intestinal, resulta relevante conocer en detalle el proceso de digestión de estos componentes lipídicos. Sin embargo, conviene señalar que el proceso de digestión de los glicéridos parciales ha sido descrito en menor detalle que el de los lípidos habituales en forma de TG (11, 21, 22). En concreto, existe escasa información sobre la relación 1-MG/2-MG obtenida después de la digestión de los glicéridos parciales o de sus mezclas. Sin embargo, este aspecto podría ser un parámetro de especial interés, ya que teniendo en cuenta el mecanismo hipocalórico descrito, podría resultar relevante buscar aquellas estrategias que permitan no sólo una alta liberación de 1(3)-MG, sino al mismo tiempo que permitan la menor producción de 2-MG posible. En este caso, la probabilidad de re-esterificación a TG y de formación de quilomicrones podría verse disminuida, debido a que la importancia de la vía glicerol-3-fosfato está más relacionada con una producción insuficiente de 2-MG que con una producción suficiente de 1-MG (23, 24).

Por tanto, poder conocer en profundidad la digestión intestinal de los glicéridos parciales podría permitir desarrollar estrategias eficientes para la formulación de ingredientes en relación a la funcionalidad deseada, bien sea aprovechar la bioactividad hipocalórica de los propios lípidos, o bien sea para su

uso en la formulación de sistemas de vehiculización de lípidos. En este sentido, el conocimiento del comportamiento durante la digestión de mezclas de DG:MG podría ser además otra alternativa de especial interés desde el punto de vista económico, ya que la producción de aceites ricos en 1(3)-MG o 1,3-DG de elevada pureza es un proceso costoso, siendo más simple y económica la obtención de mezclas de glicéridos parciales.

El estudio del proceso de digestión de glicéridos parciales mediante modelos *in vitro* podría ayudar a conocer los aspectos de interés planteados. Sin embargo, es importante destacar que en los modelos de digestión *in vitro* puede tener lugar el fenómeno de acil-migración bajo determinadas condiciones del proceso si estas no están adecuadamente controladas, lo cual podría dar lugar a resultados no fisiológicos del proceso de digestión de los lípidos. En concreto, en el caso particular de estudios de digestión *in vitro* de glicéridos parciales, el control de fenómenos de acil-migración debería ser fundamental, especialmente cuando se trate de estudiar la generación de especies como 1-MG o 2-MG tras la digestión.

4.2. OBJETIVOS

A. Proceso de digestión intestinal de TG, DG, MG y mezcla DG:MG

El primer objetivo de este trabajo fue la realización de un estudio comparativo de la digestión intestinal *in vitro* de diferentes aceites ricos en trioleína (TO), 1,3-dioleína (DO), 1-monooleína (MO) y la mezcla de DO:MO, con la intención de conocer y evaluar las diferencias en su velocidad y grado de hidrólisis, analizar los compuestos lipídicos que se liberan de la hidrólisis de cada uno de los productos de partida, y su potencial bioaccesibilidad. Además, se evaluó la importancia que tiene el fenómeno de acil-migración durante el proceso de digestión de glicéridos parciales bajo condiciones *in vitro*.

B. Aplicación del modelo de digestión intestinal *in vitro* en la selección de glicéridos parciales según la finalidad deseada.

El segundo objetivo que se planteó en el presente trabajo fue la aplicación del modelo de digestión en la evaluación y selección de glicéridos parciales como fórmulas lipídicas según la finalidad deseada, es decir, bien la selección de glicéridos parciales como agentes hipocalóricos u otras bioactividades, bien la selección de glicéridos parciales como vehículos lipídicos autoemulsionables, o bien la selección de glicéridos parciales o sus mezclas que combinen ambas finalidades.

4.3. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras lipídicas y reactivos

Las muestras lipídicas utilizadas fueron aceite rico en TG (TO), aceite concentrado de 1,3-DG (DO) y aceite concentrado de 1-MG (MO). Como aceite rico en TO se utilizó aceite de oliva comercial. Los aceites concentrados de DO y de MO se obtuvieron a través de un proceso de destilación molecular, llevado a cabo previamente por miembros del grupo de investigación IAF-UAM a partir de una mezcla comercial de glicéridos (MO, DO y TO) procedente de Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Alemania) (25).

Los reactivos utilizados a lo largo del estudio fueron los mismos descritos en el Capítulo III.

El perfil de FA y la composición lipídica de cada una de las muestras de estudio se detallan en la Tabla 1.

	TO	DO	MO	DO:MO
Lípidos (g/100 g)				
<i>Triacilgliceroles</i>	96.1	9.3	0.5	3.9
<i>1,3-Diacilgliceroles</i>	0.9	58.2	4.7	29.8
<i>1,2-Diacilgliceroles</i>	n.d.	30.3	1.0	14.0
<i>1-Monoacilgliceroles</i>	0.6	2.2	93.9	52.2
<i>2-Monoacilgliceroles</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ácidos grasos</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácidos grasos (g/100 g)				
<i>C14:0</i>	n.d.	2.3	2.3	2.3
<i>C16:0</i>	10.4	4.0	4.0	4.0
<i>C16:1</i>	0.9	6.1	6.1	6.1
<i>C18:0</i>	3.7	1.6	1.6	1.6
<i>C18:1</i>	79.1	80.5	80.5	80.5
<i>C18:2</i>	4.5	4.4	4.4	4.4
<i>C18:3</i>	0.3	0.5	0.5	0.5
<i>C20:1</i>	1.0	0.5	0.5	0.5
*n.d (no detectado)				

Tabla1. Perfil lipídico y de FA de las muestras de estudio, TO, DO, MO y mezcla de DO:MO

Modelo de digestión *in vitro*

El modelo de digestión intestinal *in vitro* utilizado en el presente capítulo se basó en el modelo utilizado en el Capítulo III de la presente Tesis, con ligeras modificaciones que serán explicadas posteriormente en el Capítulo VII de “Discusión Conjunta”. En concreto, el modelo de digestión consistió en las siguientes etapas:

- Pre-emulsión de lípidos de la dieta. Se mezclaron 0,5 g de muestra de T0 con 17 mL de Tampón Trizma-Maleico 0,1 M a pH 7,5. Para las digestiones de D0, M0 y D0:M0 (1:1, w/w) se utilizaron los mismos moles equivalentes de FA que los utilizados para la digestión de la T0. La mezcla se homogeneizó durante 2 min a 3500 rpm (Ultra-Turrax IKA T18).
- Simulación de secreción biliar. Se mezclaron 0,1 g de lecitina, 0,25 g de SB, 0,02 g de Cho, 0,5 mL de una solución de CaCl_2 325 mM, 1,5 mL de una solución de NaCl 3,25 mM y 10 mL de tampón Trizma-Maleico. Se homogeneizó durante 2 min a 3500 rpm (Ultra-Turrax IKA T18).
- Se mezclaron ambas fracciones para ser homogeneizadas durante 2 min a 3500 rpm (Ultra-Turrax IKA T18) y obtener así el medio intestinal de la digestión *in vitro*.
- Todo el medio completo fue llevado a un vaso termostatzado a 37°C y agitación magnética continua a 1000 rpm.
- La simulación de la digestión intestinal comenzó con la adición de un extracto fresco de pancreatina que se preparó con 0,5 g de pancreatina disuelto en 3 mL de tampón Trizma-Maleato a pH 7,5, posteriormente agitado durante 10 min y centrifugado a 1600 x g a 5°C durante 15 min. El sobrenadante acuoso obtenido se adicionó al medio de reacción y el precipitado obtenido fue descartado.

Para poder estudiar la evolución de la digestión en el tiempo, así como evaluar el punto final de la digestión, se tomaron alícuotas del medio de reacción a 0, 5, 10, 30 y 60 min.

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Separación de fases

Al final de la digestión, se llevó a cabo la separación de las fases MP, OP y PP del medio de digestión, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el capítulo III.

En el caso de la MP, además, se tomaron alícuotas para llevar a cabo una cuantificación de las estructuras micelares que se formaron durante la digestión,

utilizando un microscopio de haz de luz y una placa de Neubauer (Brand, Alemania) (26).

Extracción lipídica

Los lípidos totales de las alícuotas tomadas a diferentes tiempos, así como de las distintas fases del medio de digestión fueron extraídos con *n*-hexano: metil-*ter*-butil-eter (50:50, v/v) en una relación de 3:1 (v/v) de disolvente con respecto a la muestra. La mezcla fue agitada en vortex durante 1 min y posteriormente centrifugada durante 10 min a 13500 rpm. Se recuperó la fase superior orgánica y se llevo a cabo una segunda extracción con cloroformo: metanol (2:1, v/v) en una relación de 3:1 (v/v) de disolvente con respecto a la muestra. Las dos fracciones orgánicas obtenidas se juntaron y se secaron con sulfato sódico anhidro antes de ser analizadas.

Análisis de los productos lipídicos

La determinación de lípidos neutros (TO, 1,3-DO, 1,2-DO, 1(3)-MO, 2-MO y FFA) fue llevada a cabo mediante cromatografía líquida (HPLC), según el método de análisis previamente optimizado por miembros del grupo de investigación IAF-UAM (27) y utilizando una columna Agilent poroshell 120 de 2,7 μm , 100 x 4,6 mm acoplada a un HPLC Agilent 1200 Series (Avonsale, PA). El equipo presentaba un compartimento termostatzado para la columna (35°C), con una bomba cuaternaria, un auto-inyector, un desgasificador y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD). Las condiciones del ELSD utilizadas fueron 3,5 bares de presión y 35°C de T^a. Se utilizó una válvula split antes de la columna y solamente el 50% de la fase móvil llegaba al detector. El gradiente de fases móviles que se utilizó en la separación analítica de los compuestos, fue descrito previamente por miembros del grupo de investigación IAF-UAM (27). Con la idea de minimizar el error de la identificación y la cuantificación llevada a cabo, para cada bloque de muestras inyectadas, se utilizaron curvas de calibrado construidas con patrones comerciales puros de cada uno de los compuestos que se pretendían analizar.

Análisis estadístico

El análisis estadístico del presente trabajo se llevó a cabo con el modelo lineal general del programa SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) mediante el análisis de la varianza. Se consideraron diferencias significativas para valores $p \leq 0.05$. Se realizó el test Post-hoc Tukey para establecer diferencias significativas entre los valores medios de grado de hidrólisis de las muestras lipídicas estudiadas. Se utilizó el test de correlación de Pearson para estudiar la relación entre el grado de lipólisis y la formación de estructuras micelares y el nivel de MG.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Importancia del fenómeno de acil-migración en modelos de digestión intestinal *in vitro*

Cuando se llevan a cabo modelos de simulación de la digestión *in vitro*, uno de los parámetros importantes a tener en cuenta suele ser el mantenimiento del pH del medio de digestión a niveles fisiológicos, con el fin de representar una situación lo más próxima a la real, y a su vez adecuar la actividad de las enzimas digestivas al pH habitual del tracto digestivo. En este sentido, el uso de diferentes herramientas para mantener el pH a niveles fisiológicos durante el proceso de digestión intestinal *in vitro*, se encuentran frecuentemente descritas en la bibliografía (28). La metodología más habitual consiste en la adición continua y progresiva de soluciones básicas (NaOH o KOH) al medio de digestión a medida que se va produciendo una acidificación del medio por la liberación de FFA derivados de la hidrólisis enzimática. De este modo, se trata de mantener el pH del medio en valores constantes. Estas herramientas, además, permiten evaluar la evolución de la digestión a lo largo del tiempo ya que la cantidad de solución básica que se utiliza en la neutralización de FFA permite calcular el grado de hidrólisis de la reacción.

Sin embargo, en relación al mantenimiento de pH mediante soluciones básicas como las mencionadas, es importante comentar la relevancia que tiene el fenómeno de acil-migración. En concreto, la migración de posición de ácidos

grasos de la posición *sn*-2 a *sn*-1(3) se ve favorecida en algunos lípidos bajo determinadas condiciones, como la exposición prolongada a medios básicos o ácidos en combinación con temperatura. Para demostrar este efecto, en la figura 2 se detallan los resultados observados en la evolución del producto 2-MG cuando se llevó a cabo el mantenimiento del pH del medio durante la digestión de TO mediante el empleo de una solución de NaOH. Los resultados indicaron que el nivel inicial de 2-MG aumentaba durante la digestión intestinal hasta el minuto 10, sin embargo, a partir de este tiempo comenzaba a disminuir progresivamente hasta niveles minoritarios. Este resultado sólo podría explicarse por el fenómeno de acil-migración de 2-MG a 1-MG, que provocaría la hidrólisis del 1-MG por parte de la lipasa pancreática *sn*-1(3) específica, hasta niveles de MG no fisiológicos (29).

Sin embargo, cuando no se llevaba a cabo el mantenimiento del pH del medio de digestión con adición de una solución de NaOH, los niveles de 2-MG que se liberaban hasta el minuto 10 eran superiores que en presencia de NaOH, y además, no disminuían a tiempos mayores de la digestión (figura 2). Estos niveles finales de 2-MG fueron más similares a los obtenidos *in vivo* (29).

Por tanto, estos resultados indicaron la importancia de evitar y controlar las reacciones de acil-migración durante el proceso de digestión intestinal *in vitro* de lípidos en general. Pero este aspecto resulta especialmente relevante en el caso de tratar de simular el proceso de digestión de glicéridos parciales como 1,3-DG, 1,2-DG, 1-MG o 2-MG, debido al interés en poder evaluar la proporción de 1-MG/2-MG que se obtendría tras el proceso de digestión. Por tanto, en el caso particular de estudios con glicéridos parciales, cualquier artefacto del medio de digestión *in vitro* que pudiera dar lugar a una acil-migración no fisiológica, podría conducir a resultados y conclusiones erróneas, tal y como se ha evidenciado en la figura 2.

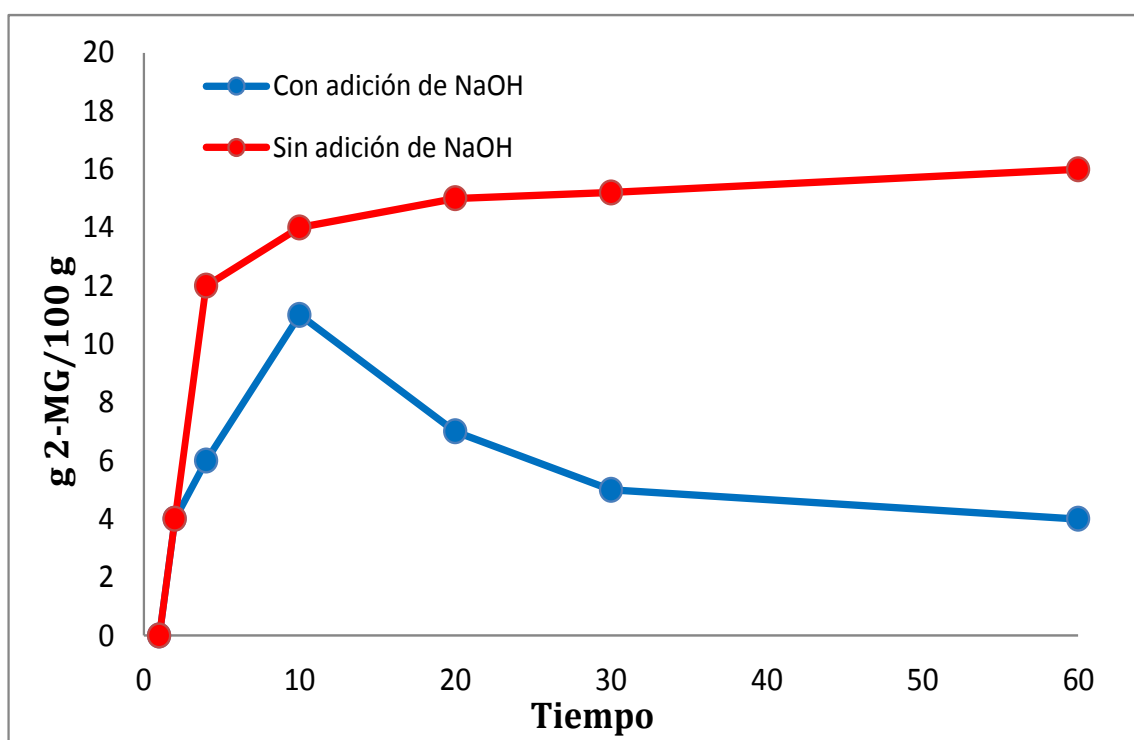


Figura 2. Liberación de 2-MG durante la digestión intestinal *in vitro* de TO en presencia y ausencia de valoración con NaOH

Finalmente, y en relación a los resultados observados en este apartado, se decidió eliminar la adición de una solución alcalina al medio de digestión, y en su lugar, para mantener el pH en un rango óptimo y fisiológico de actividad de la lipasa pancreática, se aumentó la fuerza iónica del tampón. Mediante esta herramienta, el pH variaba durante la digestión entre 7,2 al inicio de la digestión, hasta 6,5 al final de la misma. Este rango se consideró fisiológico y además, los niveles de 2-MG siguieron manteniéndose a niveles fisiológicos similares a los mostrados en la figura 2. Hay que señalar que esta modificación del modelo de digestión se aplicó tanto en el estudio del presente capítulo, así como en el modelo modificado descrito en el Capítulo III y en el resto de modelos de la presente Tesis.

4.4.2. Digestión intestinal *in vitro* de Trioleína, Dioleína, Monoleína y mezcla Dioleína:Monoleína

Se aplicó el modelo de digestión *in vitro* en la evaluación de la velocidad y el grado de la hidrólisis de cada uno de los productos de estudio, TO, DO, MO y DO:MO. En la figura 3 se representa la evolución en el tiempo de los productos de digestión de cada una de las muestras, donde se observó una disminución progresiva del sustrato inicial y un incremento de los productos lipídicos que se liberan durante la hidrólisis, observándose en todos los casos que el producto final mayoritario era el FFA.

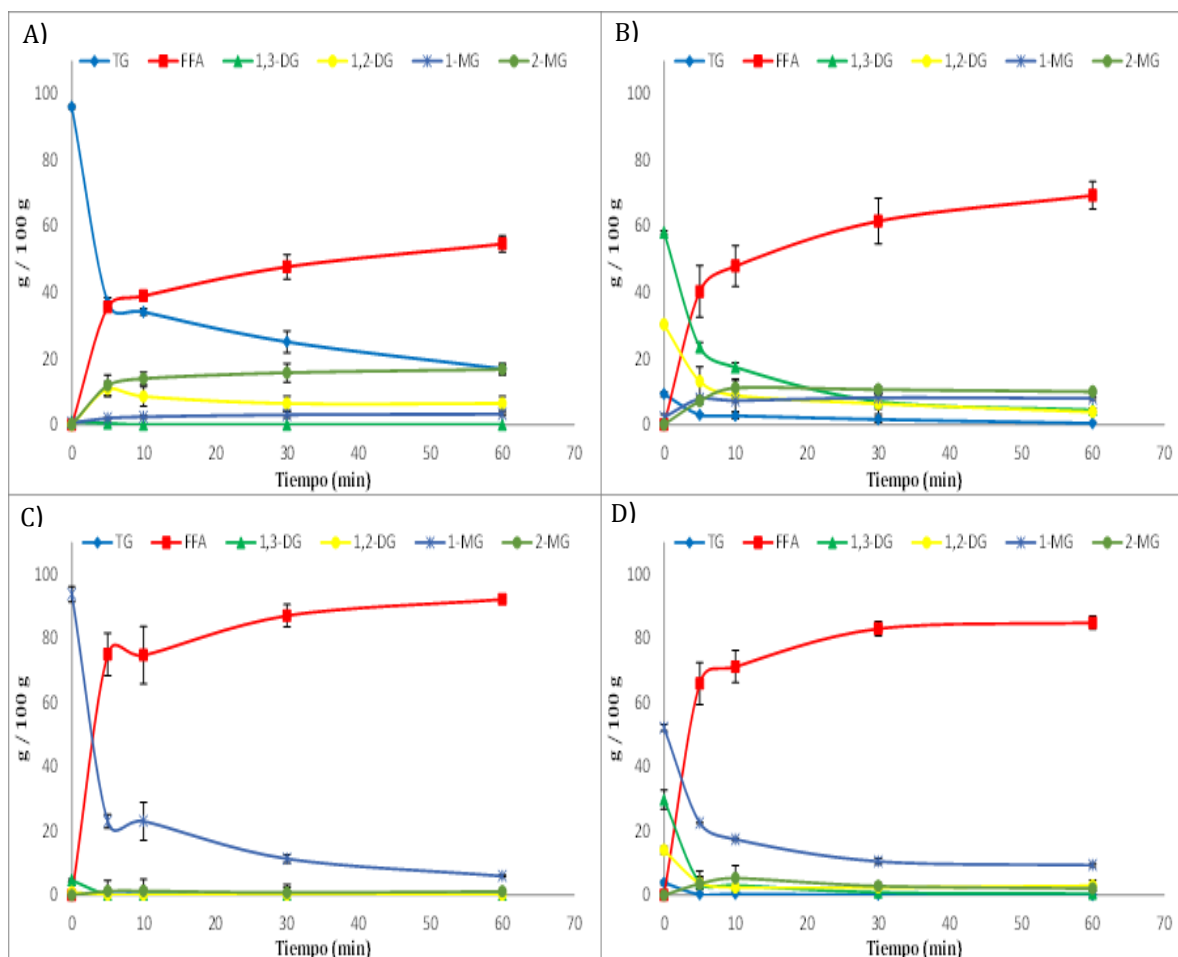


Figura 3. Evolución en el tiempo de los productos de digestión de A) TO, B) DO, C) MO y D) DO:MO

Es importante destacar que todas las muestras siguieron un comportamiento general similar, aunque se observaron diferencias de interés entre las mismas. Tomando como dato comparativo entre las muestras los FA liberados, la velocidad

de la digestión intestinal *in vitro* de cada una de las muestras del estudio presentó el siguiente orden, de menor a mayor velocidad: $TO < DO < DO:MO < MO$. En general, este resultado fue razonable, ya que una menor esterificación de los glicéridos suele llevar a una mayor velocidad y grado de hidrólisis por parte de la lipasa pancreática, debido a una mejor dispersión de los lípidos en el medio intestinal por su mayor carácter anfifílico y capacidad emulsionante, lo que provocará un acceso más efectivo de la enzima al sustrato lipídico (30).

En cuanto a los resultados observados para la forma bioactiva de interés, 1,3-DG, estos fueron similares a los descritos por otros autores en trabajos anteriores, como el de Murase et al (11), llevado a cabo en ratas después de una infusión de 1,3-DO en el yeyuno. Estos autores observaron una mayor hidrólisis tras la infusión intestinal del producto con DG que tras la infusión intestinal del producto con TO. Por otro lado, en el trabajo de Kondo et al (21) también se observó una mayor digestión de 1,3-DO con respecto a TO después de 10 min de llevar a cabo una infusión duodenal en ratas. Por otra parte, después de alimentar a ratas con dietas ricas en DG, Osaki et al (22) también pudieron observar una mayor hidrólisis del DG en comparación con el TG.

Es importante señalar que, de acuerdo con Carriere et al (31), en el caso de estudios de digestión lipídica, la hidrólisis de los lípidos debería expresarse en base al valor de “fracción absorbible”, siendo esta la suma total de FFA y MG que se produce después de la digestión. Esto es así, porque las últimas formas lipídicas consideradas absorbibles (formas finales bioaccesibles) son FFA y MG, debido a que son las formas lipídicas a las que deben de llegar los lípidos tras la digestión para poder ser absorbidos a nivel intestinal. La evaluación de este parámetro permitió conocer qué sustratos de los glicéridos parciales de estudio se encontraban en una forma absorbible al inicio de la digestión, y por tanto podrían ser presumiblemente absorbidos por los enterocitos directamente, sin necesitar una hidrólisis previa por parte de la lipasa pancreática.

De acuerdo con todo ello, y examinando la figura 4, se observó que las muestras TO y DO producen la mayor fracción lipídica absorbible sólo después de los 60 min de digestión, en comparación con la fracción absorbible al inicio de la

digestión, mientras que la muestra MO se encontraba prácticamente como fracción absorbible desde el inicio de la digestión.

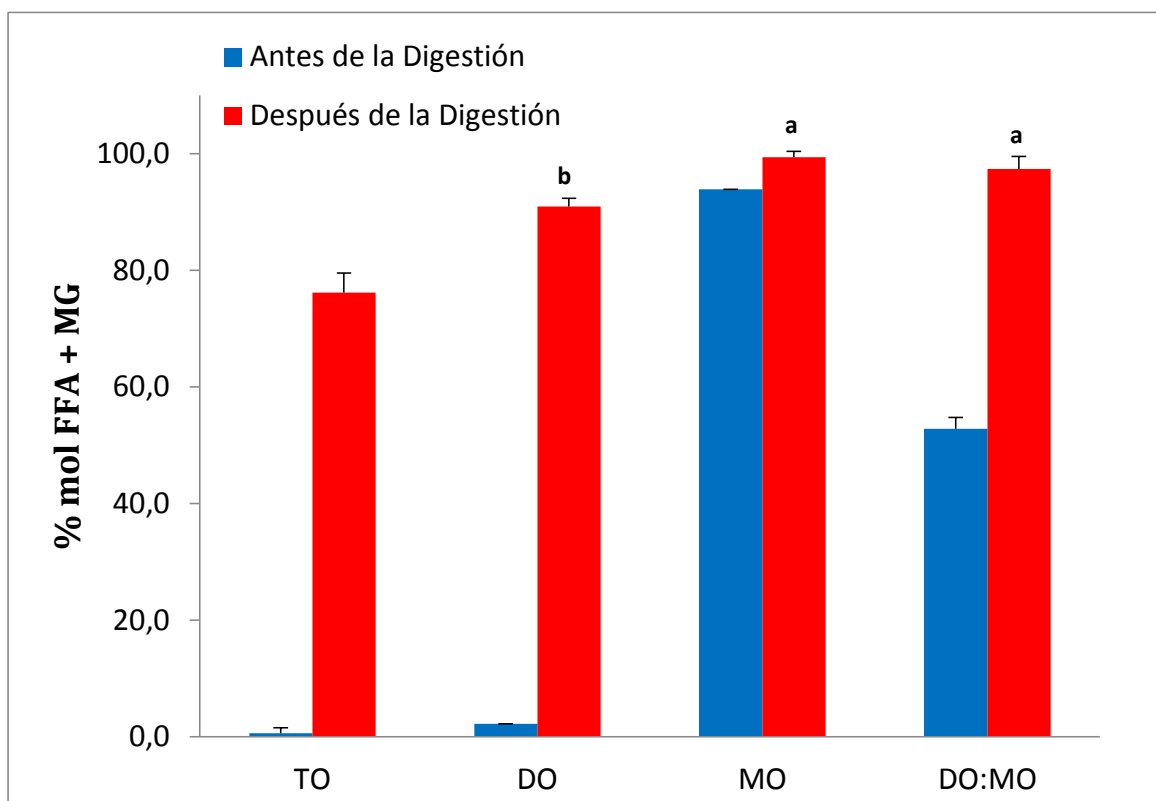


Figura 4. Productos lipídicos absorbibles antes y después de la digestión de TO, DO, MO y DO:MO

Teniendo en cuenta este resultado, se podría considerar que la muestra en forma de MO podría ser directamente absorbida sin necesidad de una hidrólisis enzimática previa. Sin embargo, de acuerdo con el grado de digestión tan marcado que se observó ya en los primeros minutos de la digestión de esta muestra (figura 3), se puede pensar que parecería más probable que se de gran parte de su hidrólisis a FFA antes de su absorción.

En el caso de la mezcla DO:MO es interesante remarcar que alrededor de la mitad del producto de partida se encontraba en forma de fracción absorbible al inicio de la digestión (figura 4). Este producto fue eficientemente transformado a fracción absorbible tras 60 min de digestión (figura 3 y 4). De hecho, es de destacar que el grado de hidrólisis alcanzado para la muestra DO:MO fue igual al de la muestra de MO, y significativamente diferente al de la muestra de DO (figura 3). Por tanto, un producto en forma de mezcla de glicéridos parciales DO:MO, en vez

de dar lugar a un resultado intermedio entre los de las muestras de DO o MO, dió lugar a una composición lipídica final después de la digestión más parecida a la de un producto en forma concentrada de MO, y más alejada del comportamiento de un producto en forma concentrada de DO. Este resultado se podría explicar debido a una mejora de la dispersión de los DG en el medio acuoso de digestión cuando se encuentran mezclados con MG, gracias al aumento de la capacidad hidrosoluble de la mezcla, relacionada con la capacidad emulgente de los MG, lo cual podría favorecer la hidrólisis total del DG en comparación con un concentrado de DG.

Las diferencias observadas se podrían también explicar en base a la teoría descrita por Reis et al (32). Estos autores describen que el 2-MG podría tener un cierto control sobre la hidrólisis de los glicéridos, a diferencia del 1-MG. De acuerdo con los resultados que estos autores indican, el 2-MG liberado de la hidrólisis lipídica tiende a acumularse en la interfase aceite-agua, disminuyendo la accesibilidad de la enzima al resto de sustratos lipídicos, e incluso desplazándola de la interfase. Por el contrario, en el caso del 1-MG, aunque también se puede acumular en la interfase a medida que se libera, este es fácilmente hidrolizado por la lipasa *sn*-1(3) específica, no interfiriendo en el acceso de la enzima a los demás glicéridos. En el presente trabajo se intentó evaluar esta hipótesis sobre la relación entre la cantidad de 1-MG y 2-MG producida tras la digestión y el grado de hidrólisis que tiene lugar. Así, como se puede observar en la figura 5, existió una correlación entre la hidrólisis alcanzada y la cantidad de MG liberado a los 10 min de la digestión en todas las muestras de estudio ($r = 0.995$).

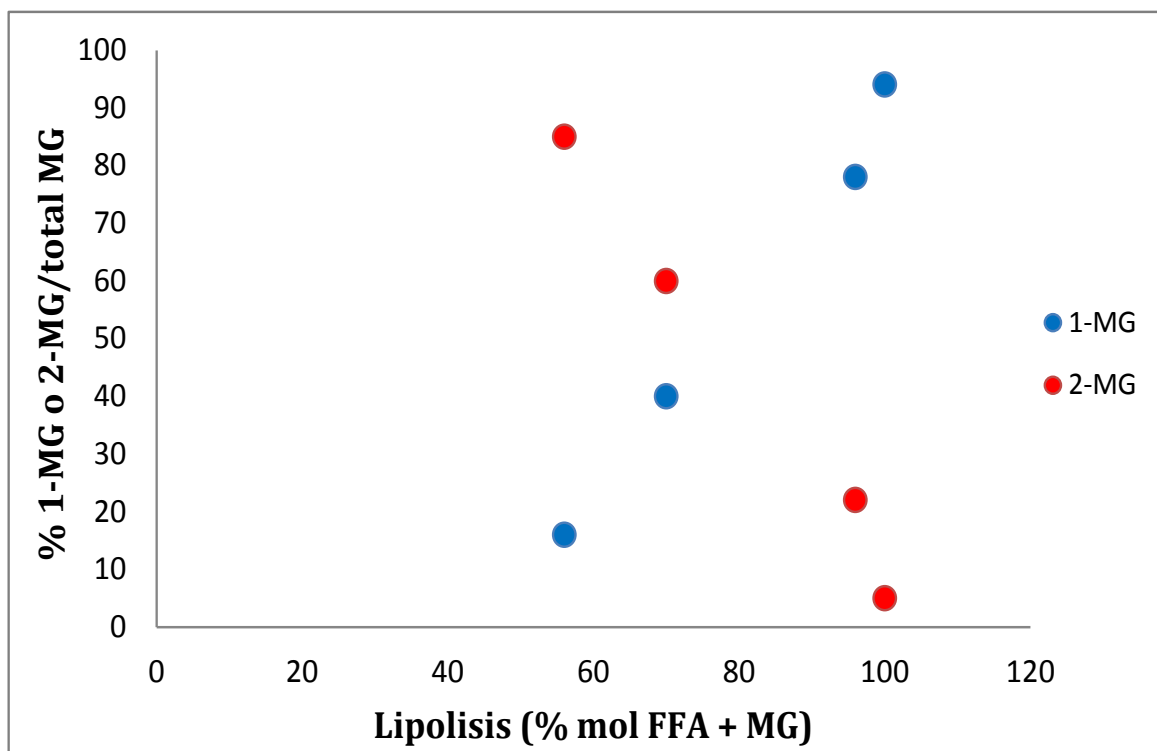


Figura 5. Hidrólisis vs proporción de 1-MG o 2-MG con respecto del total de MG a los 10 min de la digestión intestinal *in vitro*

4.4.3. Bioaccesibilidad de Trioleína, Dioleína, Monoleína y mezcla Dioleína:Monoleína

De acuerdo con los resultados representados en la figura 6, la mayoría de los productos liberados de la hidrólisis después de la digestión se encontraban distribuidos en la MP, lo que indicó una elevada bioaccesibilidad de los productos. No obstante, se observaron algunas diferencias entre las distintas muestras de estudio. Así, la menor cantidad de productos lipídicos en la MP se encontró en la muestra TO, donde el 75 % de los lípidos totales se encontraban en esta MP, mientras que cerca de un 20 % del total de los lípidos se encontraban en la OP, quedando una fracción minoritaria en la PP. Por el contrario, más del 95% de los productos lipídicos de las muestras DO, MO y DO:MO se encontraban en la fase bioaccesible (MP) (figura 6).

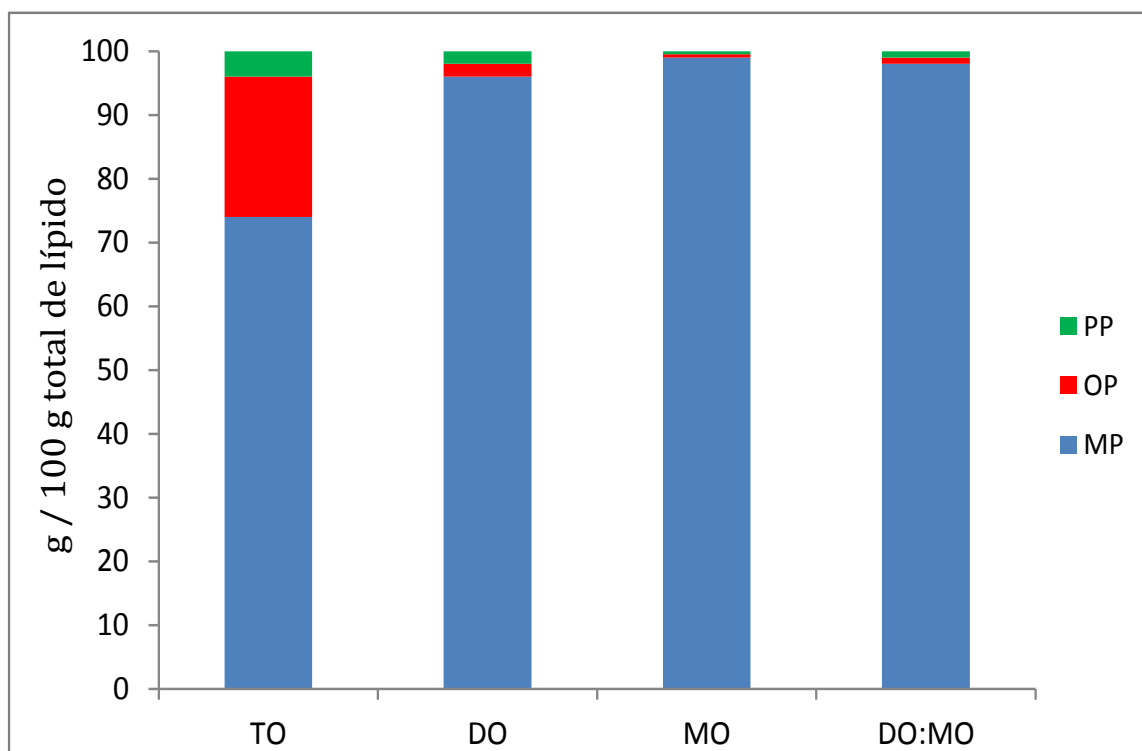


Figura 6. Distribución del total de los productos lipídicos entre las diferentes fases del medio, MP, OP y PP después de 60 min de digestión intestinal *in vitro*

Como se ha indicado anteriormente, los lípidos con carácter emulgente, como son DG y MG, se dispersan más fácilmente al inicio de la digestión que los TG, lo cual puede favorecer tanto una mejor hidrólisis, así como una mayor formación de estructuras micelares, donde se pueden incluir más fácilmente los productos de la hidrólisis mayoritarios, FFA y MG (33). De hecho, tras llevar a cabo el recuento de estructuras micelares de la MP, se pudo comprobar que se formó un mayor número de estructuras micelares tras la digestión de la muestra de MO, seguida de la muestra de DO:MO y de la DO, estando este orden de acuerdo con el mismo orden observado respecto al grado de hidrólisis (figura 7).

Por lo tanto, en el presente estudio se observó que, tanto las muestras DO, como MO y su mezcla DO:MO, son lípidos con una elevada y similar bioaccesibilidad. Además, teniendo en cuenta la mejor capacidad de dispersión y formación de estructuras micelares, las muestras de MO y DO:MO podrían ser utilizadas en la formulación de sistemas de vehiculización de ingredientes bioactivos, a los que podrían aportar su propia bioactividad y la de los productos de su hidrólisis.

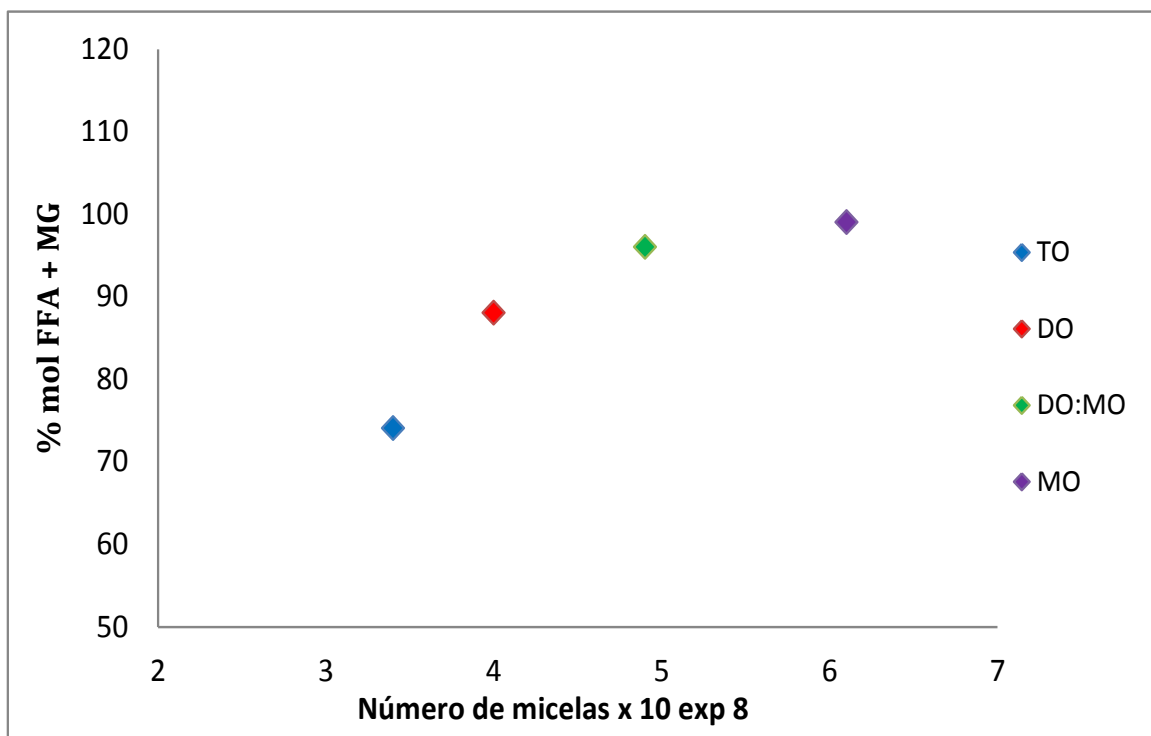


Figura 7. Correlación entre el número de micelas y el grado de hidrólisis para cada una de las muestras de estudio

4.4.4. Selección de glicéridos parciales en función de los productos 1-Monoglicérido o 2-Monoglicérido.

En cuanto al efecto hipocalórico de las formas 1,3-DG y 1(3)-MG, hay que señalar que una gran mayoría de los aceites ricos en 1,3-DG que se han descrito en la bibliografía tienen a su vez mucha cantidad de 1,2-DG, el cual producirá una elevada cantidad de 2-MG tras la digestión intestinal, cantidad que seguirá siendo metabolizada por la vía de la 2-MG aciltransferasa (34). Por tanto, en el presente trabajo se consideró interesante conseguir estrategias que permitan liberar, durante la digestión de los sustratos, no sólo elevados niveles de 1(3)-MG, sino al mismo tiempo niveles de 2-MG lo más bajos posibles. En este sentido, tal y como se ha observado en los apartados anteriores, preparaciones alternativas en forma de mezclas de 1,3-DG y 1(3)-MG podrían ser de interés. Por otro lado, en cuanto al efecto que tienen los glicéridos parciales como vehículos de fármacos o moléculas bioactivas por sus propiedades autoemulsionables, las mezclas de 1,3-DG y 1(3)-MG podrían ser de interés adicional, pues combinarían en la misma formulación tanto su capacidad anfífilica como sus propiedades bioactivas.

La aplicación del modelo de digestión intestinal *in vitro* permitió estudiar en detalle el nivel de producción de 1-MG y de 2-MG a partir de las muestras DO, MO y en la mezcla de DO:MO, y su comparativa con un control en forma de TG (TO). De este modo, se pretendió establecer las bases para facilitar la selección de aquellas preparaciones lipídicas más idóneas en función del efecto de interés deseado, es decir, bien el efecto hipocalórico bioactivo, o bien, simplemente los vehículos lipídicos potencialmente mejores, independientemente del efecto bioactivo.

En la figura 8 se representan los niveles de 1-MG y 2-MG liberados durante la digestión *in vitro* de TO, DO, MO y la mezcla DO:MO. En el caso de la muestra de referencia del estudio, TO, principalmente se liberó 2-MG con respecto a 1-MG, en una relación 5:1 (p/p). A partir de estos datos obtenidos, se hizo una estimación teórica de cuál sería el grado de re-esterificación posible por la vía de la 2-MG aciltransferasa a partir de los niveles de 2-MG generados. Para obtener este dato se estimaron los moles de 2-MG que se podrían re-esterificar en forma de TG después de la digestión, teniendo en cuenta que cada mol de 2-MG daría lugar a un mol de TG en el enterocito. Como resultado de este cálculo se observó que, del total de TO digerida (0.56 mmol), se podrían re-esterificar 0.23 mmol de TG después de los 60 min de digestión. Este dato se tomó como referencia a la hora de interpretar la magnitud de los resultados para las muestras de DO, MO o DO:MO.

Observando los resultados de la digestión de DO, se vio que la relación que se liberó de 2-MG frente a 1-MG era de 1:1 (p/p). Esto fue debido a la elevada cantidad de 1,3-DG de partida de los aceites ricos en DG (tabla 1), de los cuáles el mayor producto de la hidrólisis era el 1(3)-MG, existiendo por tanto una menor posibilidad de liberación de formas 2-MG. Realizando la estimación de la probabilidad de re-esterificación del 2-MG que se liberó de la digestión de DO, solamente 0.14 mmol de TG podrían ser re-esterificado por la vía de la 2-MG aciltransferasa. Este valor supone una reducción del 40% de TG re-esterificable por la vía del 2-MG con respecto a la cantidad de re-esterificación estimada para la muestra control TO.

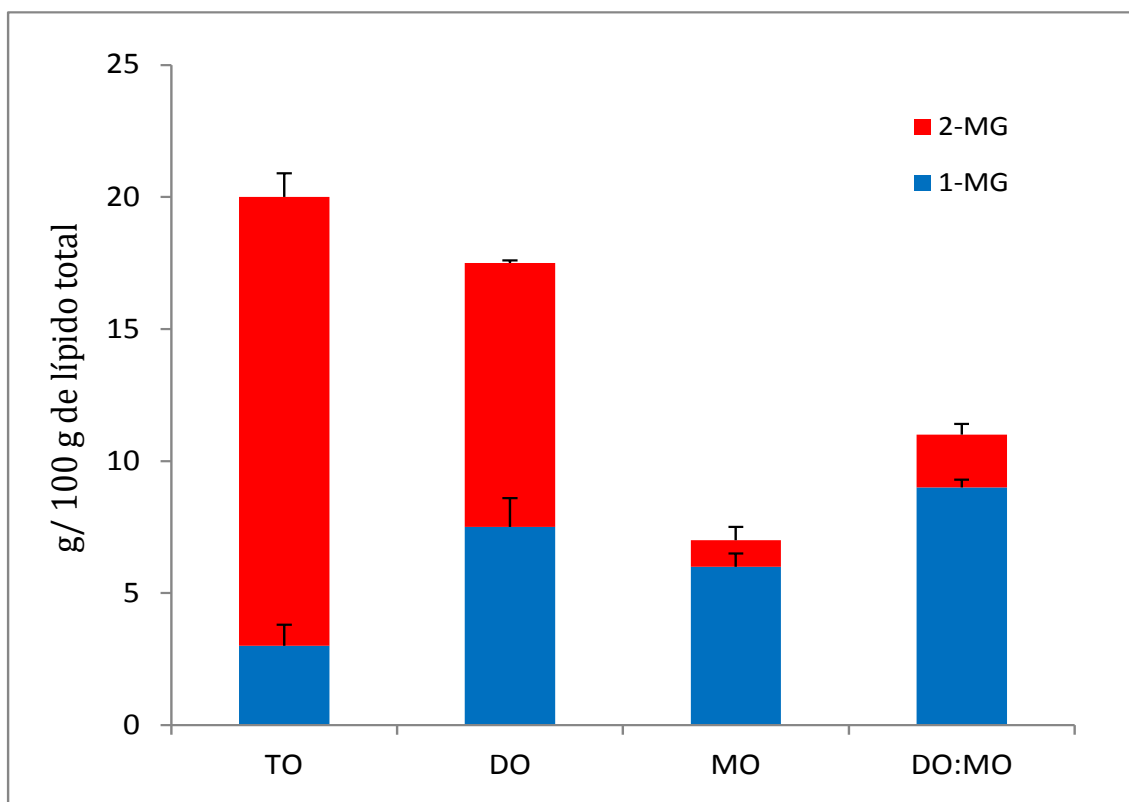


Figura 8. Niveles de 1-MG y 2-MG liberados tras la digestión intestinal *in vitro* de TO, DO, MO y la mezcla DO:MO

Es importante señalar que la menor cantidad de 2-MG se alcanzó en la digestión de la muestra de MO (figura 8), donde la relación de 2-MG frente a 1-MG fue de 1:5 (p/p). En este caso, solamente 0.02 mmol de TG podrían ser re-esterificados a partir del 2-MG por la vía de la aciltransferasa.

Teniendo en cuenta los resultados observados para las muestras de DO y de MO, es decir, tanto la elevada cantidad que se liberó de 1-MG a partir de la DO y de la MO, así como la pequeña cantidad que se produce de 2-MG a partir de la MO, el estudio de una mezcla lipídica de DO y MO fue considerado de especial interés, ya que combinaría ambos resultados, intentando así aprovechar las ventajas de ambos productos. De acuerdo con la figura 8, los resultados de la liberación de 1-MG y 2-MG de la mezcla de DO:MO mostraron una elevada cantidad de 1-MG al final de la hidrólisis junto con un bajo nivel de 2-MG, obteniéndose una relación de 4,5:1 (p/p). En este caso, el nivel elevado de 1(3)-MG podría ser debido a la posibilidad de que se vea favorecida la hidrólisis de la fracción de la DO gracias a la presencia de la MO, como ya se explicó anteriormente. En este caso, la potencial re-

esterificación de TG estimada en el enterocito de la mezcla de DO:MO produciría únicamente 0.03 mmol, lo que equivaldría a una reducción del 87% de re-esterificación con respecto a la observada en la hidrólisis de la TO.

Por lo tanto, comparando todos los resultados obtenidos en relación a la proporción 1-MG/2-MG producida durante la digestión de cada una de las muestras de estudio, se observó que la MO junto con la mezcla de DO:MO fueron las muestras que mostraron mejores resultados, dando lugar a la menor estimación de re-esterificación potencial de TG dentro del enterocito. Este resultado indicó que tanto la MO como la mezcla DO:MO podrían ser potenciales productos bioactivos atendiendo al mecanismo hipocalórico descrito para las formas 1,3-DG y 1(3)-MG. A su vez, se mostró en el apartado anterior que igualmente las muestras de MO como de DO:MO presentarían las mejores propiedades emulsionantes. Por tanto, en el caso de que el fin buscado fuera la combinación de los dos efectos planteados, es decir, un efecto hipocalórico, junto con una buena capacidad emulsionante, la mezcla DO:MO sería un producto de gran interés, ya que además, la mezcla presentaría una importante ventaja económica, al ser su producción menos costosa que la de la DO o la MO puras.

4.5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han mostrado que la digestión de glicéridos parciales puede llegar a ser diferente en función de la estructura de cada glicérido, pudiéndose observar una velocidad y un grado de hidrólisis superior a menor grado de esterificación de los glicéridos, aunque mostrando una bioaccesibilidad de los productos de la hidrólisis muy similar en todos los casos.

A su vez, se ha mostrado la relevancia que tienen los fenómenos de acil-migración en modelos de digestión *in vitro* de lípidos, pudiendo dar lugar a resultados no fisiológicos si este tipo de reacciones no son adecuadamente controladas.

Por otro lado, se ha observado que se podrían alcanzar elevadas concentraciones de 1-MG junto con bajos niveles de 2-MG tras el proceso de digestión intestinal tanto con mezclas de DO:MO, como con concentrados de MO, y de manera más eficaz que con concentrados de DO. Este aspecto mostraría evidencias de un potencial efecto hipocalórico para productos menos costosos de obtener, como sería una mezcla DO:MO. A su vez, se pudo concluir que una formulación a base de mezcla DO:MO uniría todas las propiedades funcionales y/o tecnológicas que tienen los glicéridos parciales de manera individual, es decir, no sólo efecto hipocalórico, sino a su vez, un buen efecto como vehículo autoemulsionable.

4.6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Feltes, M. M. C., de Oliveira, D., Block, J. M., & Ninow, J. L. (2013). The production, benefits, and applications of monoacylglycerols and diacylglycerols of nutritional interest. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 17-35.
- (2) Wang, X., Jin, Q., Wang, T., Huang, J., & Wang, X. (2013). An improved method for the synthesis of 1-monoolein. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 130-136.
- (3) Zhao, Y., Liu, J., Deng, L., Wang, F., & Tan, T. (2011). Optimization of *Candida* sp. 99-125 lipase catalyzed esterification for synthesis of monoglyceride and diglyceride in solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(3), 157-162.
- (4) Pouton, C. W., & Porter, C. J. (2008). Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(6), 625-637.
- (5) Pfeffer, J., Freund, A., Bel-Rhlid, R., Hansen, C.E., Reuss, M., Schmid, R.D., Maurer, S.C. (2007). Highly efficient enzymatic synthesis of 2-monoacylglycerides and structured lipids and their production on a technical scale. *Lipids*, 42, 947-953.

- (6) Dhara, R., Dhar, P., & Ghosh, M. (2013). Dietary effects of diacylglycerol rich mustard oil on lipid profile of normocholesterolemic and hypercholesterolemic rats. *Journal of food science and technology*, 50(4), 678-686.
- (7) Jandacek, R. (2007). Commercial Applications of fats in foods. *In: Fatty acids in foods and their health implications 3rd edition*. Ed Ching Kuang Chow. CRC Press. Pag 473-493.
- (8) Kristensen, J. B., Jørgensen, H., & Mu, H. (2012). Absorption difference between diacylglycerol oil and butter blend containing diacylglycerol oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(2), 146-152
- (9) Lo, S. K., Tan, C. P., Long, K., Yusoff, M. S. A., & Lai, O. M. (2008). Diacylglycerol oil-properties, processes and products: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 1(3), 223-233.
- (10) Meng, X., Zou, D., Shi, Z., Duan, Z., & Mao, Z. (2004). Dietary diacylglycerol prevents high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and abdominal adipose tissue. *Lipids*, 39(1), 37-41.
- (11) Murase, T., Aoki, M., Wakisaka, T., Hase, T., & Tokimitsu, I. (2002). Anti-obesity effect of dietary diacylglycerol in C57BL/6J mice dietary diacylglycerol stimulates intestinal lipid metabolism. *Journal of lipid research*, 43(8), 1312-1319.
- (12) Rudkowska, I., Roynette, C. E., Demonty, I., Vanstone, C. A., Jew, S., & Jones, P. J. (2005). Diacylglycerol: Efficacy and Mechanism of Action of an Anti-Obesity Agent. *Obesity research*, 13(11), 1864-1876.
- (13) Hidekatsu Yanai, Yoshiharu Tomono, Kumie Ito, Nobuyuki Furutani, Hiroshi Yoshida and Norio Tada (2007) Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome, *Nutrition Journal*, 6, 43- 50
- (14) Yanai, H., Tomono, Y., Ito, K., Hirowatari, Y., Yoshida, H., & Tada, N. (2010). A molecular mechanism for diacylglycerol-mediated promotion of negative caloric balance. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 3, 1-10.

- (15) Yanai, H., Yoshida H., Hirowatari, Y., Tada, N. (2012). Therapeutic application of diacylglycerol oil for obesity: serotonin hypothesis. *Funct Foods Health Disease*, 2, 1-10.
- (16) Matsuo, N., & Tokimitsu, I. (2001). Metabolic characteristics of diacylglycerol oil. *INFORM-CHAMPAIGN*-, 12(11), 1098-1102.
- (17) Murata, M., Hara, K., & Ide, T. (1994). Alteration by diacylglycerols of the transport and fatty acid composition of lymph chylomicrons in rats. *Biosci Biotech Biochem*, 58(8), 1416.
- (18) Chaibi, A., Ababouch, L. H., & Busta, F. F. (1996). Inhibition of bacterial spores and vegetative cells by glycerides. *Journal of Food Protection*, 59(7), 716-722.
- (19) Cho, K. H., Hong, J. H., & Lee, K. T. (2010). Monoacylglycerol (MAG)-oleic acid has stronger antioxidant, anti-atherosclerotic, and protein glycation inhibitory activities than MAG-palmitic acid. *Journal of Medicinal Food*, 13(1), 99-107
- (20) Shimotoyodome, A., Osaki, N., Onizawa, K., Mizuno, T., Suzukamo, C., Okahara, F., Hase, T. (2012). Dietary 1-monoolein decreases postprandial GIP release by reducing jejunal transport of glucose and fatty acid in rodents. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(3), G298-G310.
- (21) Kondo, H., Hase, T., Murase, T., & Tokimitsu, I. (2003). Digestion and assimilation features of dietary DAG in the rat small intestine. *Lipids*, 38(1), 25-30.
- (22) Osaki, N., Meguro, S., Yajima, N., Matsuo, N., Tokimitsu, I., & Shimasaki, H. (2005). Metabolites of dietary triacylglycerol and diacylglycerol during the digestion process in rats. *Lipids*, 40(3), 281-286.
- (23) Chung, B.M., Tappenden, K.A. (2006). Macronutrient digestion, absorption, and metabolism. In: Clinical nutrition in gastrointestinal disease. Ed Buchman A.L. SLACK Incorporated. 77-96.
- (24) Trotter, P. J., & Storch, J. (1993). Fatty acid esterification during differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. *Journal of Biological Chemistry*, 268(14), 10017-10023.

- (25) Vázquez, L., Fernandez, O., Martin, D., Reglero, G., Torres, C.F., Comparison of molecular distillation and liquid CO₂ extraction for monoolein purification. *104th AOCS, 2013, Annual Meeting & Expo*. Montreal, Canada
- (26) Soler-Rivas, C., Marin, F. R., Santoyo, S., Garcia-Risco, M. R., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2010). Testing and enhancing the in vitro bioaccessibility and bioavailability of *Rosmarinus officinalis* extracts with a high level of antioxidant abietanes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 1144-1152.
- (27) Torres, C. F., Vázquez, L., Señoráns, F. J., Reglero, G. (2005), Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector. *J. Chrom. A* 1078, 28-34.
- (28) Minekus M., Aminger M., Alvito P., Ballance S., Bohn T., Bourlieu C., Carrière F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Egger L., Golding M., Krakaya S., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A., Marze S., McClements D.J., Ménard O., Recio I., Santos C. N., Singh R. P., Vegarud G. E., Wickham M. S. J., Weitschies W. and Brodkorb A. (2014) A standardised static in-vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function* 10,1039-46
- (29) Hofmann A, Borgstrom B (1964) The intraluminal phase of fat digestion in man: the lipid content of the micellar and oil phases of intestinal content obtained during fat digestion and absorption. *J Clin Inv* 43, 247-257
- (30) Sek, L., Porter, C. J., Kaukonen, A. M., & Charman, W. N. (2002). Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 54(1), 29-41.
- (31) Carriere, F., Renou, C., Ransac, S., Lopez, V., De Caro, J., Ferrato, F., De Caro, A., Fleury, A., Sanwald-Ducray, P., Lengsfeld, H., Beglinger, C., Hadvary, P., Verger, R., Laugier, R. (2001). Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G16-G28.

(32) Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., & Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Advances in colloid and interface science*, 147, 237-250.

(33) Porter C, Charman W (2001) In vitro assessment of oral lipid based formulations. *Adv Drug Deliv Rev* 50, s127-s147

(34) Maria Teresa Tarrago-Trani, Khaterine M Phillips, Linda E Lemar, Joanne M Holden (2006) New and Existing Oils and Fats Used in Products with Reduced *Trans*-Fatty Acid Content, *J Am Diete Assoc*, 106 (6), 867-880

CAPÍTULO V

CAPÍTULO V: “DESARROLLO DE UN MODELO DE DIGESTIÓN *IN VITRO* PARA ÉSTERES DE ESTEROL Y SU APLICACIÓN A FITOSTEROLES ESTERIFICADOS CON ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO.”

Publicado en: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 11323-11330. 2012

5.1. INTRODUCCIÓN

Los primeros estudios en los cuales se comenzó a incluir PS en matrices alimentarias como ingrediente hipocolesterolémico eran llevados a cabo con formas libres de estas moléculas (1), sin embargo, la poca solubilidad de los PS libres hacía necesario el uso de elevadas dosis de los mismos para conseguir un efecto significativo. Este inconveniente se resolvió mejorando la solubilidad de estas moléculas mediante preparaciones obtenidas con diversas estrategias, destacando la esterificación de PS con FA como la estrategia de solubilización más comúnmente utilizada en la preparación de alimentos y suplementos dietéticos enriquecidos en PS. Además de mejorar la solubilidad, el balance lipofílico/hidrofílico y la inclusión de PS dentro de un alimento, la esterificación de PS es hoy en día una manera muy interesante de producir potenciales sistemas de administración de los PS y de los compuestos que llevan esterificados (1). Esto es debido a que la propia molécula esterificada puede ser un compuesto bioactivo por sí mismo, independientemente de que vaya unida a un PS (1). Así, en la bibliografía existen diferentes ejemplos de PS esterificados con compuestos bioactivos, como pueden ser esterificados con PUFA (2), con MCFA (3), con compuestos fenólicos (4) o con vitaminas como el ácido ascórbico (5).

La formación de PS esterificados con CLA (PS-CLA) por el grupo de investigación IAF-UAM (6) se planteó igualmente con la triple finalidad de 1) modificación del balance hidrofílico/lipofílico del PS por su conversión en éster de esteroles; 2) vehiculización del CLA esterificado; y 3) combinación de ambos

compuestos bioactivos, PS y CLA, en una misma molécula. En el caso particular del CLA este aspecto además resultaría de interés porque se ha descrito que la palatabilidad del CLA, cuando se administra en forma libre, no suele ser bien aceptada, por lo que se suele recomendar esterificarlo a un TG para su administración; sin embargo, esta alternativa resulta más costosa que su adición en forma libre (7). Los etil ésteres de CLA son otra alternativa de administración propuesta, pero se ha visto que parecen ser peores vehículos de CLA que su forma libre o esterificada a un TG (7, 8). Por tanto, la esterificación de CLA con PS podría ser una propuesta alternativa de interés para la administración de CLA.

Una de las cuestiones que se plantea en la evaluación de este nuevo lípido estructurado sería conocer si la forma esterificada de PS-CLA podría ser capaz de mantener de una manera efectiva las propiedades bioactivas, y si podría ser reconocida durante la digestión intestinal por las enzimas digestivas, sin verse afectada su bioaccesibilidad y bioactividad. En general, la mayoría de PS esterificados necesitan ser previamente hidrolizados durante la digestión intestinal por la enzima colesterol esterasa para poder ejercer su interacción frente a la absorción de Cho. Una vez digerido el PS, los productos liberados de la hidrólisis del éster de PS junto con los productos de digestión de otros lípidos de la dieta (FFA, MG y esteroides libres, incluyendo PS y Cho) serán solubilizados por las micelas mixtas para su transporte hasta el epitelio intestinal (9). Precisamente en la solubilización de los esteroides en las estructuras micelares puede tener lugar uno de los niveles de competición entre PS y Cho, donde la inclusión preferente de PS en estas micelas dificultaría la solubilización de Cho en las mismas para su posterior absorción.

Es importante señalar que el proceso de digestión de los ésteres de PS, su velocidad y grado de hidrólisis, así como la cantidad de Cho que serían capaces de desplazar, podrían estar determinados por diversos factores, como puede ser la diferencia entre las distintas especies químicas de PS, o la distinta naturaleza de los FA esterificados (10, 11). Por otro lado, en relación al CLA, se ha visto que su bioaccesibilidad y su biodisponibilidad podrían estar determinadas por la forma lipídica en la que se administren, como se ha visto con los TG, los etil ésteres o la forma libre del FA (7, 8).

5.2. OBJETIVOS

A. Proceso de digestión intestinal de esteroides

El primer objetivo del presente capítulo fue evaluar la digestión intestinal del producto experimental PS-CLA mediante un modelo de digestión intestinal *in vitro*, y su comparativa con un compuesto análogo en forma de PS comercial (PS-C), con la intención de evaluar las diferencias entre la velocidad y grado de hidrólisis, los productos de la hidrólisis que se liberan durante la reacción y la potencial bioaccesibilidad de estos productos lipídicos liberados.

Para ello, en primer lugar se desarrolló un modelo de digestión intestinal *in vitro* específico para ésteres de PS mediante el producto PS-C como referencia, con el fin de obtener un modelo que reflejara la digestión fisiológica de los compuestos lipídicos de estudio.

B. Aplicación del modelo de digestión intestinal *in vitro* en la evaluación de la bioactividad de PS-CLA

El segundo objetivo fue evaluar, utilizando el modelo de digestión intestinal *in vitro* desarrollado, el potencial efecto hipocolesterolémico del PS-CLA sobre el Cho a nivel de desplazamiento micelar, comparándolo con el efecto hipocolesterolémico del PS-C.

5.3. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras lipídicas y reactivos

Como muestras lipídicas se utilizaron el producto PS-CLA, obtenido por los miembros del grupo de investigación IAF-UAM (6) y un PS esterificado comercial (PS-C) de grado alimentario (Vegapure, de Cognis GmbH, Illertissen, Alemania). En la tabla 1 se muestra la composición en esteroides y FA esterificados de las muestras lipídicas de estudio.

Los reactivos utilizados a lo largo del estudio fueron los mismos descritos en el Capítulo III, además de Cho libre, TO como “lípidos de acompañamiento”, y

CAPÍTULO V

colesterol esterasa, adquiridos a Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania).

	<i>PS-C</i>	<i>PS-CLA</i>
<i>Composición en esteroides y ésteres de esteroles</i>		
Esteroides libres	2.4	7.5
Esteroides esterificados	97.6	92.5
<i>Esteroides</i>		
Brassicasterol	2.9	1.2
Campesterol	15.0	28.7
Campestanol	0.9	0.0
Estigmasterol	0.8	25.5
Sitosterol	69.5	44.8
Sitostanol	8.1	0.0
Otros	2.9	0.0
Total de PS de cadena lateral saturada^a	93.5	73.5
Total de PS de cadena lateral insaturada^b	3.7	26.7
<i>FA esterificados</i>		
Ácido Esteárico	0.0	5.9
Ácido Oleico	6.6	15.1
Ácido Linoleico	92.2	71.4

	<i>PS-C</i>	<i>PS-CLA</i>
Ácido Linolénico	0.7	5.5
Ácido Linolénico	0.7	5.5
Ácido Behénico	0.5	2.2

^a Campesterol más campestanol más
sitosterol más sitostanol

^b Brassicasterol más estigmasterol

Tabla 1. Composición en especies de PS y FA del PS-C y del PS-CLA y PS-CLA (%)

Modelo de digestión *in vitro*

El modelo de digestión *in vitro* utilizado en el presente trabajo se basó en el modelo previamente desarrollado en el Capítulo III de la presente Tesis, sobre el cual se llevaron a cabo las correspondientes modificaciones para tratar de reproducir y obtener resultados fisiológicos similares a los que se habían observado en la bibliografía para el caso particular de la digestión de ésteres de esterol. En concreto, los parámetros que se modificaron consistieron en la adición de la enzima responsable de la hidrólisis de ésteres de esterol, colesterol esterasa; así como la adición de Cho. Por otro lado, se incluyó un “lípidio de acompañamiento” en forma de TO simulando la co-ingesta de otros lípidos de la dieta junto con los ésteres de fitosterol evaluados. Todas estas modificaciones serán desarrolladas con más detalle en el apartado posterior 5.4.1.

Brevemente, el modelo de digestión *in vitro* desarrollado para ésteres de esterol presentó las siguientes particularidades:

- Al igual que en el método descrito en el Capítulo III, se adicionó 1 g de muestra lipídica, estando compuesta en este caso por 0,5 g de éster de PS (PS-C o PS-CLA) y 0,5 g de TO. El nivel de lecitina, sales biliares, sódicas y

cálcicas fue el mismo descrito para el Capítulo III. Se adicionó el Tampón Trizma-Maleato (0,1 M) a pH 7,5.

- En los estudios adicionales de evaluación del efecto hipocolesterólemico de los ésteres de PS, se incorporó Cho en forma libre al medio de digestión, siendo adicionado en una relación molar 3:1 de éster de esterol:Cho.
- A diferencia del modelo descrito previamente, la mezcla fue calentada a 50°C durante 5 min y posteriormente homogeneizada a la misma Tª (Ultra TURRAX IKA T18) durante 25 min a 7000 rpm, con el fin de facilitar la dispersión del Cho adicionado.
- La simulación de la digestión intestinal comenzó con la adición del extracto fresco de pancreatina siguiendo el procedimiento habitual ya descrito anteriormente. Por otro lado, se adicionaron 2 mL de una solución de colesterol esterasa preparada a 2 mg/mL en tampón Trizma-Maleato.
- El volumen total del medio de digestión, así como el resto de condiciones y procedimientos (temperatura, tiempo de digestión, toma de alícuotas), fueron los mismos descritos para el modelo del Capítulo III.

Separación de fases

Al finalizar la digestión, al igual que se llevó a cabo en los capítulos anteriores, se centrifugó el medio de digestión, con el fin de estudiar la potencial bioaccesibilidad de los productos de la hidrólisis. Se tomaron diversas alícuotas de las diferentes fases del medio de digestión para su posterior análisis.

Extracción lipídica

Se realizó una primera extracción siguiendo el procedimiento habitual, con *n*-hexano:metil-*ter*-butil-eter (50:50, v/v) en una relación de 3:1 (v/v) de disolvente con respecto a la muestra. A continuación, se llevó a cabo una segunda extracción con *n*-hexano:éter de petróleo (50:50, v/v) en una relación de 3:1 (v/v) de disolvente con respecto a la muestra, realizándose, finalmente, una tercera extracción con éter de petróleo:etanol (1:0.6, v/v). Las tres fracciones orgánicas obtenidas se juntaron y se secaron con sulfato sódico anhidro antes de ser analizadas.

Análisis de los productos lipídicos

Los productos de la hidrólisis fueron analizados de acuerdo a la misma metodología descrita en el Capítulo III mediante GC con detector FID.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo siguiendo la misma metodología descrita en el capítulo anterior. Se utilizó el test de correlación de Pearson para estudiar la relación entre la bioaccesibilidad de Cho y el tipo de PS.

5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1. Desarrollo del modelo de digestión intestinal *in vitro* para ésteres de esterol

Una de las principales adaptaciones que requirió el modelo de digestión fue evaluar si era necesario un enriquecimiento del medio con la enzima específica de hidrólisis de ésteres de colesterol, es decir, colesterol esterasa. Este aspecto fue necesario porque en diversos estudios encontrados en la bibliografía se había sugerido que la cantidad de colesterol esterasa detectada en la pancreatina comercial no era suficiente como para digerir los ésteres de esterol (12). Por otro lado, en otros estudios se pudo observar que otros componentes de la pancreatina comercial podrían alterar la especificidad de la colesterol esterasa (13, 14), lo que podría provocar una disminución de su actividad. En base a estas evidencias, mediante estudios preliminares, se pudo comprobar que efectivamente la hidrólisis observada únicamente con la adición de la pancreatina no alcanzaba niveles fisiológicos de digestión de los ésteres de esterol. Por tanto, se consideró necesario un enriquecimiento del medio con colesterol esterasa.

Otra modificación del modelo inicial, que ya se comentó en el Capítulo III de la presente Tesis, fue la adición de un "lípidos de acompañamiento" en forma de TG (TO). En el caso del estudio que se llevó a cabo con alquilglicérols, se pudo comprobar que la bioaccesibilidad de estos se veía mejorada en presencia de otros lípidos en el medio. Igualmente, se ha demostrado que para una adecuada

bioaccesibilidad y bioactividad de los ésteres de PS, estos necesitan co-existir con otros lípidos en el lumen intestinal para facilitar la formación de una mayor superficie de las micelas mixtas, que favorezca su inclusión en las mismas (15, 16, 17). Asimismo, mediante la inclusión de otros lípidos en el medio, se estaría simulando una ingesta más próxima a la real, en la cual los ésteres de PS se consumirán como parte de una mezcla de lípidos en la dieta, y no de forma aislada, lo cual no sería lo habitual.

Para validar los resultados del grado de hidrólisis de los ésteres de PS a través del modelo de digestión intestinal *in vitro*, se tomaron como referencia resultados *in vivo* publicados en la bibliografía. Sin embargo, se pudo observar que existe una gran variabilidad en los resultados de hidrólisis de los ésteres de PS, encontrando porcentajes de hidrólisis desde el 40 hasta el 90% (18-21).

Una de las razones por las que se encuentra tan amplia variabilidad de resultados en la bibliografía podría ser debido al tramo del tracto gastrointestinal que se haya evaluado en cada uno de los estudio. Así, en aquellos estudios en los que se encontraron menores niveles de hidrólisis, habían estudiado los primeros tramos del intestino (duodeno), mientras que en aquellos estudios donde se observaron porcentajes mayores de hidrólisis, habían estudiado tramos más avanzados del intestino (18- 20). Teniendo en cuenta que en el presente trabajo las condiciones y la composición del medio de digestión del modelo *in vitro* intentaban simular las condiciones de las secciones iniciales del intestino, los trabajos *in vivo* seleccionados como referencia del grado de hidrólisis de ésteres de PS, correspondieron a los llevados a cabo en los primeros tramos del intestino, es decir, en torno a un 40-50% de hidrólisis (18, 21).

Tal y como se muestra en la figura 1, tras la aplicación del modelo de digestión intestinal *in vitro* desarrollado, el grado de hidrólisis alcanzado del PS-C fue en torno a un 50%, liberándose PS libre y FFA (28% y 19%, respectivamente) como productos finales de la hidrólisis. Comparando estos datos con lo observado *in vivo* (figura 1), se consideró que el modelo desarrollado era capaz de reflejar una hidrólisis fisiológica de ésteres de PS, y por lo tanto podría ser utilizado en el estudio experimental de la digestión del PS-CLA.

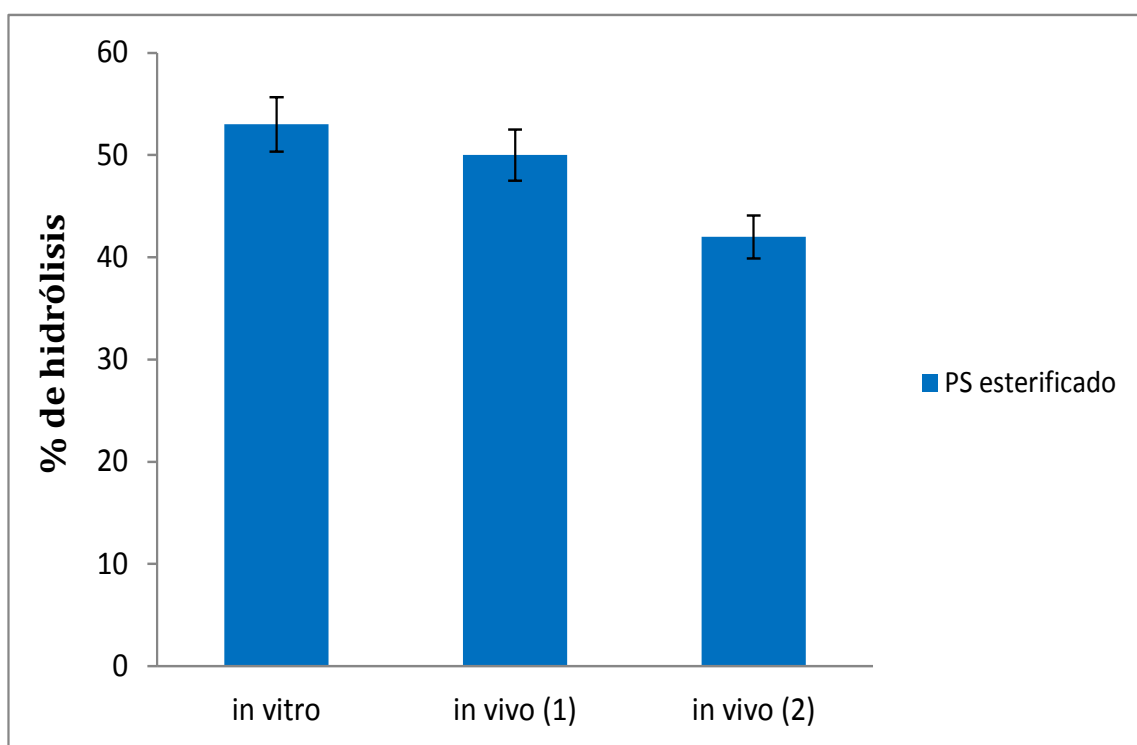


Figura 1. Grado de hidrólisis (%) de la digestión intestinal *in vitro* de PS-C, y de la digestión intestinal *in vivo* de ésteres de PS de mostrados por 1) Miettinen et al (20) y 2) Niessen et al (21)

5.4.2. Digestión intestinal *in vitro* de Fitosterol esterificado con Ácido Linoleico Conjugado

Tal y como se muestra en la figura 2, las enzimas digestivas utilizadas en el modelo de digestión *in vitro* fueron capaces de reconocer de manera efectiva el PS-CLA, alcanzando una hidrólisis próxima al 50% del sustrato de partida, siendo comparable al porcentaje obtenido en la hidrólisis del PS-C ($p = 0.355$) (figura 2). Así, la hidrólisis del PS-CLA liberó cantidades similares de productos de hidrólisis que el PS-C, con un 30% de PS libre y un 21% de FFA. Por lo tanto, las diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en la composición de ambos productos, en relación a los esteroides y los FA (tabla 1), no determinó ninguna diferencia en la magnitud de sus digestiones intestinales. Este resultado indicó que un PS esterificado con CLA podría ser una potencial fuente de CLA libre y de PS libres durante la digestión intestinal, con grados de hidrólisis comparables a los de otros PS esterificados de carácter comercial.

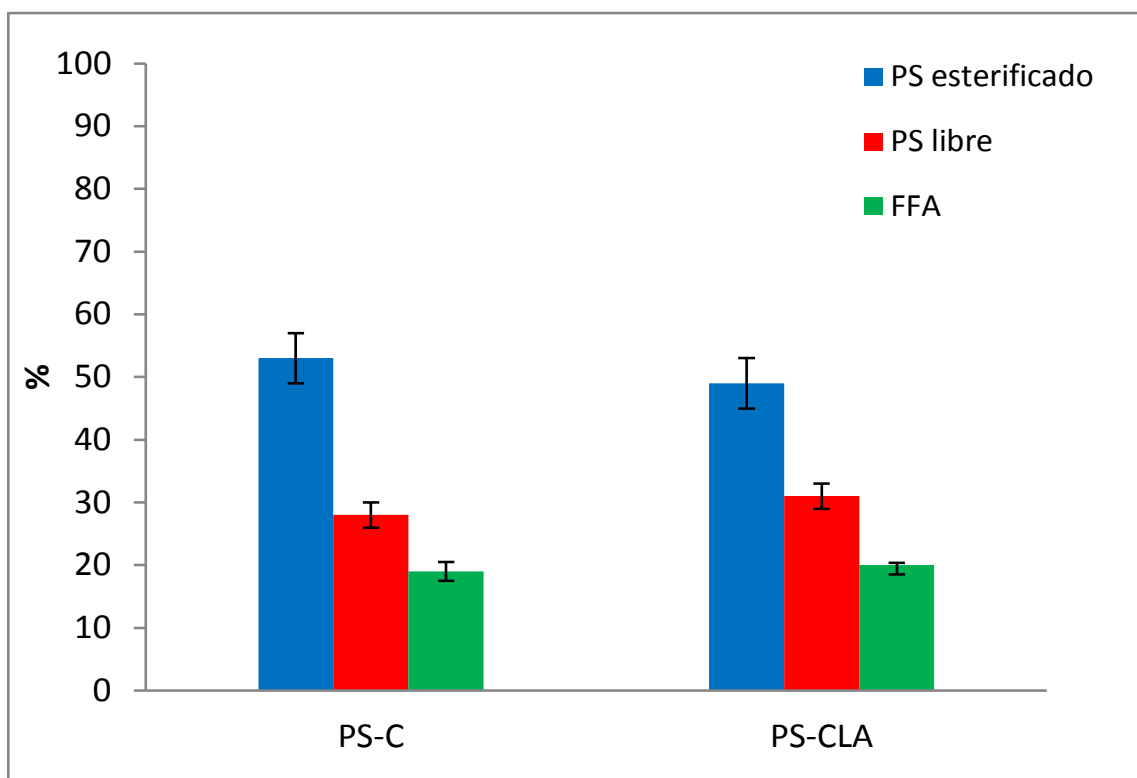


Figura 2. Productos de la hidrólisis (%) de PS-C y PS-CLA después de la digestión intestinal *in vitro*. No se representan los productos de la hidrólisis de la TO de acompañamiento.

En base a los resultados obtenidos, y con el fin de evaluar la relevancia de la cantidad de CLA liberado de la hidrólisis, se llevaron a cabo una serie de estimaciones teniendo en cuenta la cantidad de CLA que se recomienda consumir para tener un efecto bioactivo de este FA, de acuerdo con la bibliografía. Aunque este dato es variable, la cantidad más frecuentemente recomendada para que tenga lugar este efecto bioactivo es de 3 g de CLA/día (21, 22). Por tanto, este valor se asumió como la dosis efectiva que se debe absorber de CLA para que tenga lugar un efecto bioactivo del mismo, considerándose que esta cantidad será potencialmente bioaccesible. Por otro lado, según la “European Food Safety Authority”, el nivel de consumo recomendado de ésteres de PS para tener un efecto hipocolesterolémico es de 1,5-3 g de PS/día (23). Por tanto, en base a las cantidades recomendadas de ambos compuestos (CLA y PS), y en base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se estimó que una digestión de la dosis máxima recomendada de 3 g/día de PS-CLA podría liberar, aproximadamente, un 20% de la dosis bioactiva de CLA. Tomando como referencia

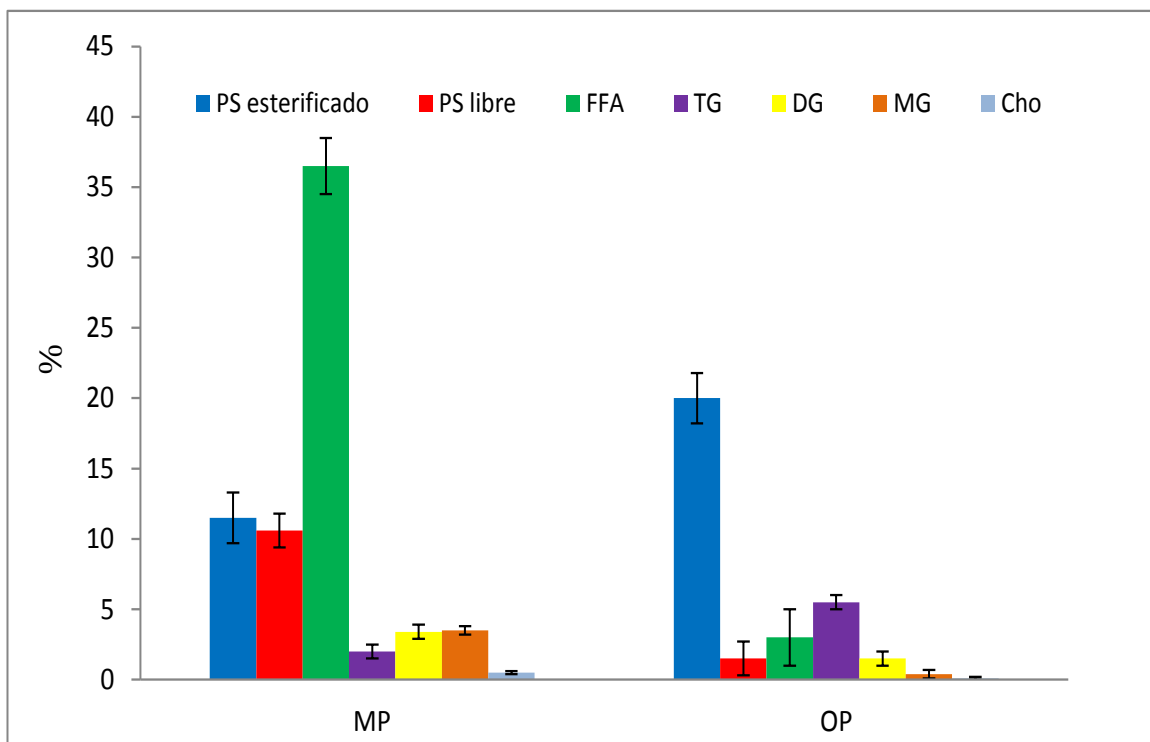
una fuente natural de CLA, como la leche (0,6 g de CLA/100 g de grasa), un vaso de leche aportaría un 1.8% de la dosis bioactiva de CLA. Por tanto, la cantidad de CLA liberado por el PS-CLA sería más de 10 veces superior al aporte de CLA de un vaso de leche. En cualquier caso, estas estimaciones se realizaron únicamente con fines de evaluar la magnitud de los resultados obtenidos. Sin embargo, serían necesarios estudios adicionales *in vivo* para poder validar los resultados y las estimaciones realizadas.

Comparando con otros vehículos de CLA, Gervais et al (8) observaron que TG-CLA suele ser hidrolizado de manera rápida y completa, como la mayoría de los TG. Sin embargo, con respecto a etil ésteres de CLA, la biodisponibilidad de estos vehículos lipídicos era bastante limitada en función de la absorción (7). Por lo tanto, el producto de síntesis PS-CLA podría ser otra alternativa de vehiculización de CLA con la característica adicional de llevar un esqueleto bioactivo en forma de PS.

5.4.3. Bioaccesibilidad de Fitosterol esterificado con Ácido Linoleico Conjugado

En la figura 3 se representa la composición lipídica de las fases de cada uno de los productos de estudio, el PS-C y el PS-CLA. La separación de los productos de la hidrólisis entre las fases tras la digestión de PS-CLA fue comparable a la del PS-C (figura 3). Así, para ambas muestras, se observó que la mayoría de los productos lipídicos se encontraban incluidos en la MP (alrededor del 68% y el 66% del total de lípidos del medio de digestión de las muestras PS-C y PS-CLA, respectivamente), permaneciendo el resto de los productos lipídicos de la hidrólisis en la OP (entorno a un 32 y un 34% del total de lípidos del medio de digestión de las muestras PS-C y del PS-CLA, respectivamente). Por otro lado, para ambas muestras se observó un pequeño precipitado (PP) en cantidad despreciable (alrededor del 1% del total de los lípidos).

A)



B)

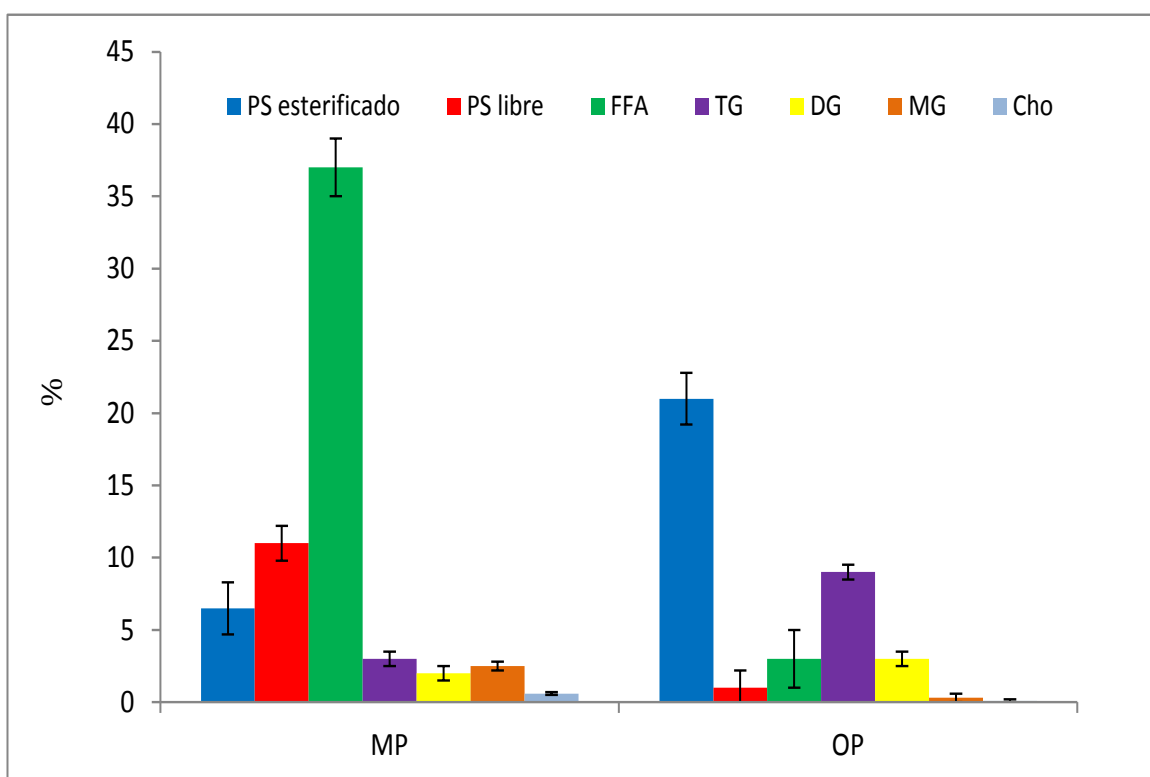


Figura 3. Distribución del total de los productos de la hidrólisis (%) entre la OP y la MP después de la digestión intestinal *in vitro* de a) PS-C y b) PS-CLA

En la MP principalmente se encontró FFA, PS libres, PS-CLA residual que no se llegó a hidrolizar y glicéridos procedentes de la TO. De acuerdo con estos resultados, la mayoría de los productos con interés bioactivo procedentes del PS-CLA (PS libre y CLA) se encontraban incluidos en la MP, lo cual podría indicar una elevada bioaccesibilidad de los mismos. Además, en relación a estos resultados es interesante resaltar que la solubilización de PS libres en las estructuras micelares de la MP podría ubicarlos en una localización adecuada para interferir en la bioaccesibilidad del Cho y ejercer así el efecto bioactivo.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio podrían sugerir que la bioaccesibilidad de los productos de la digestión del PS-CLA parece ser comparable a la bioaccesibilidad de los productos de la digestión del PS-C. No obstante, serían necesarios estudios *in vivo* que permitieran la confirmación de estos resultados.

5.4.4. Estudio de la bioaccesibilidad del colesterol en presencia de Fitosterol esterificado con Ácido Linoleico Conjugado

La absorción intestinal fisiológica del Cho es similar a la de la mayoría de los lípidos, en el sentido de que es necesario que sea previamente solubilizado en las micelas para su posterior absorción por los enterocitos (24). Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los compuestos lipídicos, la absorción del Cho procedente de la dieta es más limitada y variable, encontrándose datos de absorción en trabajos previos desde el 40 hasta el 60% (25). En este sentido, es conocido que los componentes de la dieta pueden influir en la disponibilidad del Cho, aumentando o disminuyendo su absorción (25).

Tal y como ha sido expuesto anteriormente, uno de los mecanismos propuestos para explicar el efecto hipocolesterolemico de PS es su potencial capacidad de limitar la absorción intestinal del Cho debido a su desplazamiento de las micelas, como consecuencia de la solubilización preferente del PS en las mismas frente a Cho. Es importante recordar que el PS libre fue uno de los productos mayoritarios de la hidrólisis del PS-CLA después de la digestión intestinal *in vitro*, el cual principalmente se encontraba incluido en la MP (alrededor del 92% del total de PS libre) (figura 3). Por tanto, para evaluar el potencial efecto bioactivo de este producto lipídico como un agente limitador de la

biodisponibilidad del Cho, se llevaron a cabo una serie de ensayos con digestiones intestinales *in vitro* del PS-CLA y del PS-C en presencia de Cho. Conocer el reparto del Cho entre las tres fases del medio de digestión, en presencia y en ausencia de PS, permitió estimar el posible efecto de desplazamiento de los PS sobre el Cho de la fracción bioaccesible (MP) hacia las fracciones no bioaccesibles del medio.

Para poder estudiar el efecto del PS en la bioaccesibilidad del Cho se añadió al medio de digestión Cho en forma de Cho libre, debido a que el Cho a nivel micelar suele ser mayoritariamente libre (12). Se añadió en una relación molar 3:1 de éster de PS frente a Cho, de acuerdo a la relación previamente estimada por Brown et al (12). Este ratio fue establecido por estos autores teniendo en cuenta la recomendación de consumo diario de ésteres de PS de la Food and Drug Administration (1,3 g de PS/día) y el consumo medio de Cho estimado de 257 mg /día.

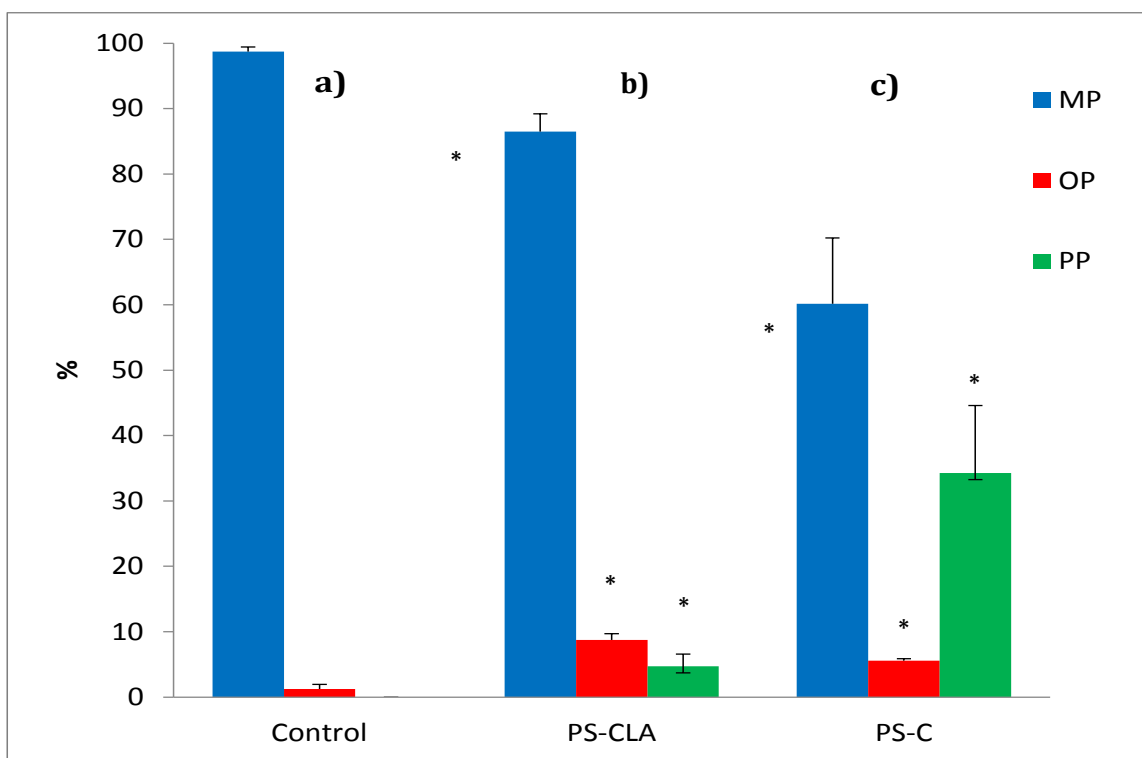


Figura 4. Distribución del total de Cho entre la MP, la OP y la PP después de a) la digestión intestinal *in vitro* en ausencia de ésteres de PS, b) la digestión intestinal *in vitro* del PS-CLA y c) la digestión intestinal *in vitro* del PS-C. * valores entre las mismas fases fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) entre los ensayos.

En la figura 4 se representa de manera detallada la distribución del Cho total entre las diferentes fases para cada uno de los ensayos. Se compararon los

resultados con respecto a una digestión *in vitro* control realizada en ausencia de PS, en el cual se observó que prácticamente la totalidad del Cho se encontraba solubilizado en la MP (figura 4a). Sin embargo, tras la digestión en presencia de ésteres de PS, la distribución del Cho cambiaba, y este compuesto era desplazado parcialmente de la MP a la OP y a la PP. Así, cuando el Cho era combinado con PS-CLA en el medio de digestión, aproximadamente el 14 % de este Cho era desplazado de la MP (figura 4b), en relación con el control en ausencia de PS. Este resultado indicaba que el PS-CLA podría tener un potencial efecto hipocolesterolémico. No obstante, el PS-C hidrolizado causó un efecto de desplazamiento del Cho de la MP mayor que el que se observó para el PS-CLA (36% de desplazamiento del Cho).

Resulta interesante destacar además que el Cho desplazado por el PS-C se encontró principalmente en la PP, mientras que el Cho que había sido desplazado por el PS-CLA se encontraba de un modo más homogéneo repartido entre la OP y la PP.

La comparación de estos resultados con los trabajos *in vivo* resulta complicada, teniendo en cuenta que los resultados obtenidos están basados en condiciones *in vitro*, es decir, en condiciones muy simples que no consideran todos los mecanismos del tracto gastrointestinal que podrían intervenir en la disminución de la absorción de Cho por parte de los PS. Sin embargo, algunos resultados *in vivo* podrían resultar comparables a los obtenidos en el presente estudio. Vanhanen et al (26) observaron valores entorno al 17-19% de reducción de absorción de Cho en un estudio con éster de sitostanol, al igual que Varady et al (27), que señalaron valores de disminución de la absorción de Cho del 16-18% en un estudio combinado del efecto de PS y el ejercicio físico en adultos. Recientemente, Amiot et al (28) han llevado a cabo un trabajo de evaluación *in vivo* del efecto de PS sobre la solubilización de Cho a nivel intestinal, en el cual se observó una reducción de Cho en la MP a nivel duodenal de cerca del 27% con respecto al control, después de una ingesta de ésteres de PS. Otros estudios de interés, con los cuales se puede ver que los resultados de reducción de absorción del Cho en estudios *in vivo* pueden ser muy diversos, fueron los llevados a cabo por Ostlund et al (29), donde los autores señalaron una disminución en el rango del

5,6-36,7% en la absorción de Cho; o el estudio de Miettinen et al (19), en el que se detectó una reducción de absorción de Cho del 40%.

En relación a los resultados observados en el presente estudio en cuanto al efecto hipocolesterolémico, distintas hipótesis podrían utilizarse para explicar las diferencias encontradas entre el PS-C y el PS-CLA. Por un lado, la diferente composición, tanto cuantitativa como cualitativa, en las formas específicas de fitosteroles (PS) y fitostanoles (PE) de ambas muestras (tabla 1) podría determinar la diferente magnitud de solubilización en las micelas, y por tanto la diferente competición con el Cho por la inclusión en las mismas. De hecho, una de las principales diferencias encontrada entre ambos productos fue que en el PS-CLA prácticamente todo eran esteroides, mientras que el PS-C contenía una importante fracción de estanoles. En este sentido, se ha visto en diversos estudios que los estanoles libres parecen ser más efectivos en la reducción de la absorción de Cho que los esteroides libres (30, 31), aunque también se han encontrado estudios en los cuales no se han detectado diferencias en el efecto sobre el Cho entre los PS y los PE, o sus ésteres (32).

Otra diferencia que podría afectar al distinto nivel de reducción de la absorción de Cho de cada uno de los productos de estudio podría estar relacionado con el hecho de que el PS-C apenas contenía estigmasterol en su composición, mientras que el PS-CLA mostraba una importante cantidad del mismo (tabla 1). En este sentido, se ha descrito que las cadenas laterales saturadas, como las del sitosterol, campesterol y sus estanoles análogos, incrementaban la hidrofobicidad de estos compuestos y con ello, la co-cristalización de PS con Cho, en comparación con las cadenas insaturadas, como la del estigmasterol (33). En general, tal y como se observa en la tabla 1, el PS-C presentaba elevados niveles de PS de cadena lateral saturada, en comparación con el PS-CLA. Esto podría llevar a una mayor co-cristalización de PS con Cho del PS-C con respecto al PS-CLA. Este mecanismo de acción tiene lugar en el tracto intestinal debido a la existencia de un límite de capacidad de las micelas para solubilizar compuestos poco hidrosolubles, como los esteroides. Estos esteroides tenderán a co-cristalizar en las micelas, y una vez que las micelas se saturan con esteroides cristalizados, estos co-precipitan junto con el Cho que igualmente se encuentra en las micelas (34, 35). Prestando atención a este mecanismo en los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo, se observó un

incremento de la cantidad de Cho en la PP (figura 6), así como de PS (datos no mostrados), para ambas muestras analizadas, lo cual indicaría un aumento de la precipitación de ambos compuestos. De hecho, la cantidad de Cho precipitado mostró una correlación lineal positiva con la cantidad total de PS de cadena lateral saturada precipitada, independientemente de las muestras, PS-C o PS-CLA (tabla 2).

	<i>r</i> (Chol x PS)	<i>Coefficiente de determinación</i> (<i>r</i> ²)	<i>Signif</i>
Campesterol+campestanol	0.839	0.704	0.037
Sitosterol+sitostanol	0.967	0.936	0.002
Total PS	0.921	0.848	0.009
Total PS con cadena saturada	0.956	0.915	0.003
Total PS con cadena insaturada	-0.413	0.171	0.415

Tabla 2. Correlación entre el precipitado de Cho y el precipitado de PS después de la digestión intestinal del PS-C y del PS-CLA.

Además, la precipitación del Cho estuvo más relacionada con los PS con cadena lateral saturada en las formas de sitosterol y de sitostanol, que con los PS con cadena lateral saturada en las formas de campesterol y campestanol (tabla 2). Este último resultado podría confirmar que la interacción entre Cho y PS puede ser diferente en función del isómero de PS, indicando el resultado obtenido en este estudio, que la precipitación de Cho podría ser debida mayoritariamente a las formas sitosterol y sitostanol. Este planteamiento estaría de acuerdo con estudios previos descritos en la bibliografía, como el llevado a cabo por Mel'nikov et al (35). Por tanto, teniendo en cuenta el mayor contenido inicial de sitosterol y sitostanol en el caso del PS-C en comparación con PS-CLA (tabla1), este parámetro podría marcar las diferencias observadas entre ambas muestras en el efecto sobre Cho.

Por otra parte, el grado de solubilización de Cho o de PS en las estructuras micelares podría también depender de la composición en otros lípidos del medio intestinal, pudiendo verse afectados por el grado de insaturación y la longitud de la cadena de los FA (11, 12). El PS-C se encontraba casi totalmente esterificado por ácido linoléico (LA), mientras que el PS-CLA se encontraba principalmente esterificado por CLA (tabla 1). Uehara et al (36) han descrito un comportamiento diferente del CLA en relación al LA con respecto a algunos parámetros como el punto de fusión, las estructuras subcelulares o el polimorfismo, en los cuales el CLA parece comportarse de un modo más parecido a un FA saturado o *trans*-monoinsaturado, más que a un ácido graso insaturado como el LA. Resulta difícil explicar el efecto que podrían tener estas diferencias entre el CLA y el LA sobre el desplazamiento de Cho causado por los PS esterificados con estos ácidos grasos, pues no se tienen evidencias científicas previas acerca del efecto de FA conjugados en la bioaccesibilidad de los esteroides, o en su interferencia a nivel micelar. En cualquier caso, sería un factor que resultaría de interés explorar.

Por otra parte, es importante mencionar que durante la separación de las fases después de la digestión de PS-C en presencia de Cho, se diferenciaban claramente las tres fases, donde la MP se apreciaba con mucha claridad, homogénea y con una ligera turbidez típica de esta fase. En cambio, en la separación de fases de PS-CLA en presencia de Cho no se observaba con tanta claridad esta separación, destacándose además una MP heterogénea y turbia. En base a estos resultados, se llevó a cabo un estudio adicional de separación de fases después de la digestión, tanto del PS-C como del PS-CLA en presencia de Cho, pero en ausencia de colesterol esterasa, es decir, sin permitir la hidrólisis de los ésteres de PS. En este caso se apreció que la separación de fases de ambos sustratos era más fácil en ausencia de su hidrólisis y con una turbidez similar, lo que indicó que en el caso de existir una digestión, los productos liberados de la hidrólisis de PS-CLA y de PS-C podrían ser los responsables de la diferente conformación y composición de las fases, y podrían determinar así la diferente distribución de Cho en la MP tras la digestión de PS-CLA con respecto a la de PS-C.

Es interesante resaltar que el menor desplazamiento de Cho por parte del PS-CLA en comparación con el PS-C no disminuiría el potencial valor del PS esterificado con CLA como un lípido bioactivo, ya que, como se ha evidenciado, esta

molécula podría ser un potencial vehículo de CLA libre después de la digestión intestinal. Además, en base a las evidencias observadas, se podría pensar que el desarrollo de ésteres de esterol con CLA utilizando otras formas de PS con mayor efecto hipocolesterolémico, como sitosterol y sitostanol, podría mejorar dicha bioactividad, sumada a la del efecto del CLA. No obstante, sería necesario llevar a cabo una evaluación más completa para saber si la liberación del CLA y PS sería efectiva desde el punto de vista de su bioaccesibilidad y biodisponibilidad, y si su nivel de bioactividad sería suficiente en condiciones *in vivo*.

5.5. CONCLUSIONES

Se desarrolló un modelo de digestión intestinal *in vitro* para digerir ésteres de esterol, capaz de proporcionar resultados fisiológicos similares a los que se habían observado en la bibliografía *in vivo*. Este nuevo modelo de digestión intestinal *in vitro* de esteroides fue una herramienta clave en el estudio del producto de síntesis en forma de PS-CLA ya que los resultados indicaron que el PS-CLA se digería de manera similar a un éster de PS comercial de referencia, tanto en grado como en productos de hidrólisis. En base a estos resultados, el lípido estructurado en forma de PS-CLA podría ser propuesto tanto como una fuente de PS, así como un potencial vehículo de CLA, debido a que tras su hidrólisis a nivel intestinal liberaría cierta cantidad de CLA bioaccesible junto con PS libre.

Por otro lado, el PS-CLA mantendría las propiedades bioactivas propias de los PS, relacionadas con la disminución de la absorción intestinal de Cho, aunque en menor medida que el PS-C de referencia.

Por lo tanto, con el presente trabajo se ha contribuido al conocimiento específico de determinados mecanismos de acción que pueden tener lugar durante la digestión intestinal, tanto de esta forma esterificada de PS con CLA y su acción sobre el desplazamiento de Cho, así como de ésteres de PS en general. Sin embargo, serían necesarios ensayos *in vivo* que permitan validar los resultados observados en el presente trabajo.

5.6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Torres, C. F.; Martin, D.; Torrelo, G.; Casado, V.; Fernandez, O.; Tenllado, D.; Vazquez, L.; Moran-Valero, M. I.; Reglero, G. Lipids as delivery systems to improve the biological activity of bioactive ingredients. *Curr. Nutr. Food Sci.* (2011), 7, 160-169.
- (2) Demonty, I.; Chan, Y. M.; Pelled, D.; Jones, P. J. H. (2006) Fish-oil esters of plant sterols improve the lipid profile of dyslipidemic subjects more than do fish-oil or sunflower oil esters of plant sterols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 84, 1534-42.
- (3) Torrelo, G.; Torres, C. F.; Reglero, G. Enzymatic strategies for solvent-free production of short and medium chain phytosteryl esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2012), 114, 670-676.
- (4) Xu, Z. M.; Godber, J. S. Purification and identification of components of gamma-Oryzanol in rice bran oil. *J. Agric. Food Chem.* (1999), 47, 2724-2728.
- (5) Kutney, J. P.; Milanova, R. K.; Ding, Y.; Chen, H.; Duanjie, H. US Patent Application 20020156051, (2002).
- (6) Torres, C. F.; Torrelo, G.; Vazquez, L.; Señorans, F. J.; Reglero, G. Stepwise esterification of phytosterols with conjugated linoleic acid catalyzed by *Candida rugosa* lipase in solvent-free medium. *J. Biosci. Bioeng.* (2008), 106, 559-562.
- (7) Fernie, C. E.; Dupont, I. E.; Scruel, O.; Carpentier, Y. A.; Sebedio, J.; Scrimgeour, C. M. Relative absorption of conjugated linoleic acid as triacylglycerol, free fatty acid and ethyl ester in a functional food matrix. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2004), 106, 347-354.
- (8) Gervais, R.; Gagnon, F.; Kheadr, E. E.; van Calsteren, M.; Farnworth, E. R.; Fliss, I.; Chouinard, P. Y. Bioaccessibility of fatty acids from conjugated linoleic acid-enriched milk and milk emulsions studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Int. Dairy J.* (2009), 19, 574-581.
- (9) Hui, D. Y.; Howles, P. N. Molecular mechanisms of cholesterol and transport in the intestine. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2005), 16, 183-192.

- (10) Bonsdorff-Nikander, A.; Christiansen, L.; Huikko, L.; Lampi, A.; Piironen, V.; Yliruusi, J.; Kaukonen, A. M. A comparison of the effect of medium- vs long-chain triglycerides on the in vitro solubilization of cholesterol and/or phytosterol into mixed micelles. *Lipids*. (2005), *40*, 181-190.
- (11) Rasmussen, H. E.; Guderian, D. M.; Wray, C. A.; Dussault, P. H.; Schlegel, V. L.; Carr, T. P. Reduction in cholesterol absorption is enhanced by stearate-enriched plant sterol esters in hamsters. *J. Nutr.* (2006), *136*, 2722-2727.
- (12) Brown, A. W.; Hang, J.; Dussault, P.H.; Carr, T. P. Plant sterol and stanol substrate specificity of pancreatic cholesterol esterase. *J. Nutr. Biochem.* (2010), *21*, 736-740.
- (13) Chitchumroonchokchai, C.; Failla, M. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J. Nutr.* (2006), *136*, 588-594.
- (14) Moreau, R. A.; Hicks, K. B. The in vitro hydrolysis of phytosterol conjugates in food matrices by mammalian digestive enzymes. *Lipids*. (2004), *39*, 769-776.
- (15) Denke, M. A. Lack of efficacy of low-dose sitostanol therapy as an adjunct to a cholesterol-lowering diet in men with moderate hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.* (1995), *61*, 392-396.
- (16) Jones, P. J. H.; Vanstone, C. A.; Raeini-Sarjaz, M.; St-Onge, M. Phytosterols in low- and nonfat beverages as part of a controlled diet fail to lower plasma lipid levels. *J. Lipid Res.* (2003), *44*, 1713-1719.
- (17) Brown, A. W.; Hang, J.; Dussault, P. H.; Carr, T. P. Phytosterol ester constituents affect micellar cholesterol solubility in model bile. *Lipids*. (2010), *45*, 855-862.
- (18) Miettinen, T. A.; Gylling, H. Serum cholesterol lowering properties of plant sterols. Proceedings of COST 916. 2nd workshop. Bioactive inositol phosphates and

phytosterols in foods. Luxembourg: European Community Office of Official Publications. (1997).

(19) Miettinen, T. A.; Vuoristo, M.; Nissinen, M.; Jarvinen, H. J.; Gylling, H. Serum, biliary, and fecal cholesterol and plant sterols in colectomized patients before and during consumption of stanol ester margarine. *Am. J. Clin. Nutr.* (2000), 71, 1095-1102.

(20) Nissinen, M. J.; Gylling, H.; Vuoristo, M.; Miettinen, T. A. Micellar distribution of cholesterol and phytosterols after duodenal plant stanol ester infusion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* (2002), 282, G1009-G1015.

(21) Ip, C.; Singh, M.; Thompson, H. J.; Scimeca, J. A. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.* (1994), 54, 1212-1215.

(22) Campbell, W.; Drake, M. A.; Larick, D. K. The impact of fortification with conjugated linoleic acid (CLA) on the quality of fluid milk. *J. Dairy Sci.* (2003), 86, 43-51.

(23) EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2008) Plant stanol esters and blood cholesterol - Scientific substantiation of a health claim related to plant stanol esters and lower/reduced blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006[1] - Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies

(24) Fatouros D, Bergenstahl B, Mullertz A (2007) Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during in vitro digestion. *Eur J Pharm Sci* 31: 85-94

(25) Ramirez, M.; Amate, L.; Gil, A. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum. Dev.* (2001), 65, s95-s101

(26) Vanhanen, H. T.; Blomqvist, S.; Ehnholm, C. Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols in hypercholesterolemic subjects with different apoE

phenotypes during dietary sitostanol ester treatment. *J. Lipid Res.* (1993), 34, 1535-1544.

(27) Varady, K. A.; Houweling, A. H.; Jones, P. J. H. Effect of plant sterols and exercise training on cholesterol absorption and synthesis in previously sedentary hypercholesterolemic subjects. *Transl. Res.* (2007), 149, 22-30

(28) Amiot, M. J.; Knol, D.; Cardinault, N.; Nowicki, M.; Bott, R.; Antona, C.; Borel, P.; Bernard, J.; Duchateau, G.; Lairon, D. Phytosterol ester processing in the small intestine: impact on cholesterol availability for absorption and chylomicron cholesterol incorporation in healthy humans. *J. Lipid Res.* (2011), 52, 1256-1264.

(29) Ostlund, R. E.; Spilburg, C. A.; Stenson, W. F. Sitostanol administered in lecithin micelles potently reduces cholesterol absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* (1999), 70, 826-831.

(30) Carr, T. P.; Jesch, E. D. Food components that reduce cholesterol absorption. *Adv. Food Nutr. Res.* (2006), 51, 165-204.

(31) Heinemann, T.; Pietruck, B.; Kullak-Ublick, G.; von Bergmann, K. Comparison of sitosterol and sitostanol on inhibition of intestinal cholesterol absorption. *Agents Actions Suppl.* (1988), 26, 117-122.

(32) Moreau, R. A.; Whitaker, B. D.; Hicks, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress Lipid Res.* (2002), 41, 457-500.

(33) Armstong, M. J.; Carey, M. C. Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. *J. Lipid Res.* (1987), 28, 1144-1155.

(34) Mel'kinov, S. M.; Seijen ten Hoorn, J. W. M.; Eijkelenboom, A. P. A. M. Effect of phytosterols and phytostanols on the solubilization of cholesterol by dietary mixed micelles: an in vitro study. *Chem. Phys. Lipids.* (2004), 127, 121-141.

(35) Mel'nikov, S. M.; Seijen ten Hoorn, J. W. M.; Bertrand, B. Can cholesterol absorption be reduced by phytosterols and phytostanols via a cocrystallization mechanism? *Chem. Phys. Lipids.* (2004), 127, 15-33.

(36) Uehara, H.; Suganuma, T.; Negishi, S.; Uda, Y.; Furukawa, Y.; Ueno, S.; Sato, K. Physical properties of two isomers of conjugated linoleic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2008), 85, 29-36

CAPÍTULO VI

CAPÍTULO VI: “DESARROLLO DE UN MODELO DE DIGESTIÓN *IN VITRO* PARA FOSFOLÍPIDOS Y SU APLICACIÓN A FOSFOLÍPIDOS ESTERIFICADOS CON HIDROXITIRO SOL.”

Publicado en: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9751-9759. 2014

6.1. INTRODUCCIÓN

Los compuesto fenólicos son conocidos antioxidantes naturales con propiedades bioactivas. Dentro de este grupo de compuestos polifenólicos se encuentra el hidroxitirosol (HT) (figura 1.B), una molécula de especial interés en las últimas décadas debido a que ha demostrado tener, no sólo un importante poder antioxidante, sino una interesante bioactividad, ambos relacionados con efectos antiaterogénicos, anti-inflamatorios, antimicrobianos, antitumorales; efectos de regulación del envejecimiento y efectos frente a la agregación plaquetaria (1- 3).

Se ha observado en estudios de la bibliografía que el HT parece absorberse correctamente en el tracto gastrointestinal, aunque su biodisponibilidad es bastante limitada, debido a que se metaboliza rápidamente en el enterocito y en el hígado a metabolitos más pequeños, encontrándose únicamente niveles muy bajos de HT libre en plasma y en algunos tejidos (4-6). Basándose en estas evidencias, en los últimos años se está mostrando un especial interés en la producción de derivados de HT que puedan mejorar su acceso a los tejidos y a las células, o que puedan incrementar su vida media en plasma, con la intención de poder aprovechar más eficientemente sus efectos bioactivos (7-9). En relación a este tema, se está llevando a cabo una amplia investigando por diversos autores en los últimos años en relación a la producción de "lípidos fenólicos", es decir,

estructuras lipídicas resultantes de la unión de un lípido con un compuesto fenólico (10), entre los que se incluye el HT. Una de las estrategias más frecuentemente utilizada para modificar compuestos fenólicos es su esterificación con cadenas acilo. En el caso concreto de derivados de HT, entre los ejemplos encontrados en la bibliografía se destaca el trabajo de Trujillo et al (9), en el que se observó que derivados de HT con ésteres de cadena larga dieron lugar a un efecto protector frente al daño oxidativo mayor en modelos *ex vivo* que los derivados sin esterificar. Se han encontrado en la bibliografía otros trabajos con derivados de HT en forma de etil ésteres, los cuales se ha observado que podrían absorberse de una manera más efectiva que el HT libre. Además, se ha estudiado que estos derivados de HT parecen mostrar una mayor actividad anticancerígena con respecto al HT libre (11, 12), lo cual incrementaría el valor bioactivo del HT.

De acuerdo con la obtención de nuevos derivados de compuestos fenólicos, y tal como se comentó en el Capítulo I, miembros del grupo de investigación IAF-UAM han desarrollado recientemente un derivado de HT en forma de PL (13), en el cual el compuesto fenólico se encuentra incluido en la cabeza polar del PL mediante la sustitución de la colina a través de una reacción de transfosfatidilación. Esta nueva molécula, denominada fosfatidilhidroxitirosol (PHT) (figura 1.C) podría ser propuesta como un potencial vehículo de HT, que combinaría en la misma molécula la bioactividad del HT junto a la bioactividad del PL, el cual se considera una molécula bioactiva por sí mismo (Capítulo I). Por otro lado, debido a su naturaleza anfifílica, los PL contribuyen en la emulsión de las gotas lipídicas durante la digestión de los lípidos, mejorando la acción de la lipasa pancreática. Además, desempeñan un importante papel en la formación de micelas mixtas y estructuras micelares, necesarias para transportar los productos lipídicos liberados de la hidrólisis a los enterocitos (14, 15).

Siguiendo el mismo planteamiento que en capítulos anteriores, una de las cuestiones que se plantea en la evaluación de este nuevo lípido estructurado sería conocer si la molécula PHT podría ser capaz de mantener de una manera efectiva las propiedades bioactivas, y si podría ser reconocida durante la digestión intestinal por las enzimas digestivas, sin verse afectada su bioaccesibilidad y

bioactividad. En este sentido, es importante señalar que en el caso particular de compuestos fenólicos, ha sido previamente descrito en la bibliografía, cómo determinadas moléculas pueden ver modificada su bioactividad durante el paso a través del tracto gastrointestinal. Esto es así, bien por el simple hecho de ir sufriendo un proceso de hidrólisis y degradación enzimática hacia otras moléculas que podrían mostrar una bioactividad diferente; o bien por la exposición a las propias condiciones del medio, como puede ser el pH, temperatura, tiempo, o interacción con otros compuestos coexistentes en el medio digestivo procedentes de la ingesta (16, 17).

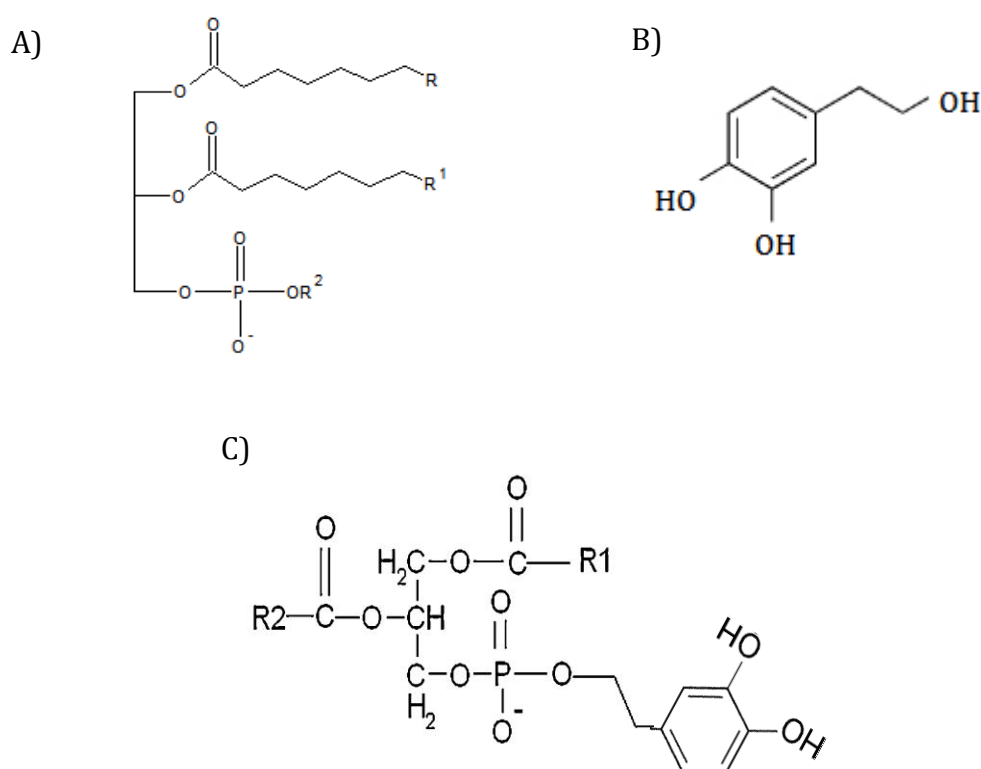


Figura 1. Estructura química de A) un PL, B) HT y C) PHT

6.2. OBJETIVOS

A. Proceso de digestión intestinal de fosfolípidos

El primer objetivo del presente capítulo fue la evaluación de la digestión intestinal de PHT, mediante un modelo de digestión intestinal *in vitro*, y su comparativa con un PL de referencia, con la intención de evaluar las diferencias

entre la velocidad y grado de hidrólisis, los productos de la hidrólisis que se liberan durante la reacción y la potencial bioaccesibilidad de estos productos lipídicos liberados.

Para ello fue necesario desarrollar previamente un modelo de digestión intestinal *in vitro* para PLs, utilizando el fosfolípido de referencia, que permitiera comprobar que el modelo reflejaba los resultados de digestión fisiológicos que tienen lugar en el intestino durante la hidrólisis de estos compuestos lipídicos.

B. Evaluación del efecto del proceso de digestión *in vitro* sobre la actividad antioxidante

El segundo objetivo del trabajo fue evaluar cómo afecta el proceso de digestión *in vitro* al potencial efecto antioxidante del PHT. En concreto, se utilizó el modelo de digestión *in vitro* para estudiar esta variación de la actividad antioxidante tanto de HT libre, así como del PHT, antes y después de la digestión, para establecer el correspondiente estudio comparativo.

6.3. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras lipídicas y reactivos

El PHT fue previamente sintetizado por miembros del grupo de investigación IAF-UAM mediante una reacción enzimática de transfosfatidilación entre HT (pureza superior al 90%), adquirido a Seprox Biotech (Madrid, España), y fosfolipon 90H adquirido a Lipoid (PL 90H) (Suiza) (13). La composición final del producto obtenido fue de 86% PHT, 8% HT y 6% PL 90H. Para llevar a cabo el desarrollo del modelo de digestión se utilizó como lípido de referencia el mismo PL que se utilizó en la síntesis del PHT (PL 90 H). Como lípido de acompañamiento de los fosfolípidos en la digestión intestinal *in vitro* se utilizó aceite de oliva comercial.

Los reactivos utilizados a lo largo del estudio fueron los mismos descritos en capítulos anteriores, además de solución de hidróxido de amonio al 30% adquirida a Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania) y PLA₂ procedente de

Streptomyces violaceoruber (10^3 U/mg) adquirida a Nagase Chemtex Corporation (Fukuchiyama Factory, Kyoto, Japan).

Modelo de digestión *in vitro*

El modelo de digestión *in vitro* utilizado en el presente trabajo se basó en el modelo previamente desarrollado en los capítulos III y IV de la presente Tesis, sobre el cual se llevaron a cabo las correspondientes modificaciones para tratar de reproducir y obtener resultados fisiológicos similares a los que se habían observado en la bibliografía para el caso particular de PLs. Los aspectos que se modificaron del modelo inicial fueron los siguientes:

- *Adición de una fracción lipídica exógena simulando la procedente de la dieta*, conteniendo TG y PL en proporciones habituales de ingesta
- *Adición de una fracción lipídica endógena simulando la procedente de la secreción biliar*, conteniendo SB y PL en las proporciones fisiológicas
- *Adición de fosfolipasa A2 (PLA₂)*, enzima responsable de la digestión de los PLs

Todas estas modificaciones serán desarrolladas con más detalle en el apartado 6.4.1.

En este caso, la mezcla lipídica consistió en 0,5 g de aceite de oliva y 0,1 g de PL (PL de referencia ó PHT) y adición de 16 mL del tampón de digestión habitual. Esta fracción se homogeneizó (Ultra TURRAX IKA T18) durante 2 min a 3500rpm.

Por otro lado, se preparó la fracción lipídica que simularía la procedente de la secreción biliar, realizándose del mismo modo descrito en el Capítulo IV.

A continuación se mezclaron ambas fracciones para dar lugar al medio de digestión intestinal completo y se homogeneizaron (Ultra TURRAX IKA T18) durante 2 min a 3500 rpm.

La simulación de la digestión intestinal comenzó con la adición de un extracto fresco de pancreatina siguiendo el procedimiento habitual ya descrito anteriormente. Por otro lado, se adicionó 1 mL de una solución de PLA₂ preparada a 5 mg/mL en tampón Trizma-Maleato.

El resto de condiciones y procedimientos (temperatura, tiempo de digestión, toma de alícuotas), fueron los mismos descritos para capítulos anteriores.

Separación de fases

Al finalizar la digestión, al igual que se llevó a cabo en los capítulos anteriores se estudió la potencial bioaccesibilidad de los productos de la hidrólisis mediante la separación y análisis de las fases MP, OP y PP. Además, se tomaron alícuotas de la MP para llevar a cabo una cuantificación de las estructuras micelares que se habían formado durante el proceso de digestión, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Capítulo IV.

Extracción lipídica

Los lípidos totales fueron extraídos con cloroformo: metanol: ácido fosfórico (100:80:4, v/v/v) en una relación de 3:1 (v/v) de disolvente con respecto a la muestra. La mezcla fue agitada en vortex durante 1 min y posteriormente centrifugada durante 10 min a 13500 rpm. Se llevó a cabo una segunda extracción en las mismas condiciones que la primera. Las dos fracciones orgánicas obtenidas se unieron y se secaron con sulfato sódico anhidro antes de ser analizadas.

Análisis de los productos lipídicos

Los productos de la hidrólisis fueron analizados mediante cromatografía de líquidos (HPLC) acoplada a un detector evaporativo de dispersión de haz de luz (ELSD).

La fracción de lípidos polares (PL, liso-PL, PHT, liso-PHT, HT, SB) fue determinada mediante una columna de diol Luna HILIC de 5 μ m (250 mm, 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, California, USA) acoplada a un HPLC de Agilent Serie 1200 con un compartimento para la columna termostatizado, una bomba cuaternaria, un auto-inyector, un degasificador y un detector ELSD. El método utilizado se basó en un método previamente desarrollado por Casado et al (13) con algunas modificaciones. El caudal utilizado fue de 1,5 mL/min, dividiéndose dicho caudal en dos partes mediante una válvula de flujo después del compartimento termostatizado de la columna, para hacer llegar tan solo una parte de la fase móvil directamente al detector (3,5 bares y 55°C). Las fases móviles utilizadas en el

análisis consistieron en un gradiente terciario de A: hexano, B: hexano/2-propanol/ácido acético/trietilamina (815/170/15/0,5, v/v/v/v) y C: 2-propanol/H₂O Milli-Q/ácido acético/trietilamina (840/140/15/0,5, v/v/v/v). El método utilizado para llevar a cabo la separación de los productos lipídicos comenzaba con un 50% de A y un 50% de B, aumentando hasta un 100% de B a los 5,1 min. En el minuto 20 alcanzaba un 12% de C y un 88% de B, manteniéndose en estos valores durante 15 min. A continuación las proporciones del método cambiaban a un 40% de C y un 60% de B en 0,5 min. Finalmente, el gradiente de fases móviles volvió a condiciones iniciales y se mantuvo durante 20 min.

Para llevar a cabo la identificación y cuantificación de cada uno de los productos de la reacción se utilizaron patrones comerciales estándar y se construyeron las correspondientes curvas de calibrado para cada conjunto de muestras inyectadas. En el caso del producto de digestión liso-PHT, fue necesario llevar a cabo una purificación previa del mismo como se describirá más adelante.

La fracción de lípidos neutros (TG, DG, MG y FFA) fue determinada siguiendo la misma metodología descrita en el Capítulo IV.

Purificación de liso-PHT para el análisis

Para conseguir una cuantificación apropiada de los productos de la digestión de PHT se llevó a cabo una purificación del producto liberado durante la hidrólisis, el liso-PHT. Para ello fue necesario, 1) el desarrollo de un protocolo de hidrólisis del PHT a liso-PHT que liberara cantidades de liso-PHT suficientes para poder purificar la mayor cantidad de producto posible, y 2) el desarrollo de un protocolo de purificación del liso-PHT liberado de la hidrólisis.

1) Hidrólisis de PHT a liso-PHT

Se llevaron a cabo una serie de modificaciones del modelo de digestión de PL utilizado en el presente trabajo para conseguir una hidrólisis del PHT lo más completa posible. Tras una serie de pruebas preliminares, los resultados indicaron que era necesario añadir al medio de digestión otros componentes lipídicos y/o agentes surfactantes para conseguir el mayor grado de hidrólisis. Como medio lipídico se mantuvo el aceite de oliva del modelo, y como agente surfactante se reemplazaron las SB del modelo de digestión por MG. Se realizó este reemplazo

debido a que las SB eran difíciles de separar del liso-PHT y del liso-PL durante el proceso posterior de purificación, resultando esta separación mucho más sencilla utilizando MG.

En base a estas modificaciones, el modelo de hidrólisis consistió en 80 mg de PHT mezclados con 80 mg de aceite de oliva y 60 mg de MG, con 0,4 mL de una solución de CaCl_2 325 mM, 1,2 mL de una solución de NaCl 3,25 mM y 20,6 mL de tampón Trizma-Maleato a pH 7,5. Se añadió un extracto de pancreatina, preparado con 0,3 g de pancreatina en 1,8 mL de tampón Trizma-Maleato de pH 7,5, agitado durante 10 min y centrifugado a 1600 x g durante 15 min, y un extracto de PLA_2 , preparado con 0,2 g de PLA_2 en 2 mL de tampón Trizma-Maleato a pH 7,5, agitado en vortex durante 1 min. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo a 37°C en un agitador orbital (IKA KS 4000 ic control) a 120 rpm durante 120 min. Al final de la reacción, los productos lipídicos liberados de la hidrólisis fueron extraídos del medio con cloroformo: metanol (2:1, v/v) para llevar a cabo la purificación y posterior análisis de los mismos. En estas condiciones, se alcanzó una hidrólisis de PHT próxima al 95%, liberándose como productos mayoritarios liso-PHT y FFA.

2) Purificación de liso-PHT mediante SPE

Después de la reacción de hidrólisis, la composición en lípidos del medio de digestión era de aproximadamente 45% de FFA y 35% de liso-PHT, junto a pequeñas cantidades de PHT residual, liso-PL y MG, que se purificaron mediante SPE para poder obtener una fracción de liso-PHT lo más pura posible. El método de SPE utilizado para la purificación se basó en la combinación de dos métodos previamente descritos en la bibliografía: el método de Mateos et al (18), descrito para la separación de compuestos fenólicos de aceites vegetales; y el método de Carelli et al (19), descrito para la separación de distintas clases de fosfolípidos de aceites vegetales.

Se comenzó la purificación siguiendo el protocolo desarrollado por Mateos et al (18), utilizando una columna de SPE con relleno de diol de 500 mg (Isolute, Biotage, UK), acondicionado previamente con 6 mL de metanol y 6 mL de hexano. Se adicionó 1 mL de muestra lipídica a una concentración de 40 mg/mL en

cloroformo. La purificación se inició con la elución de los glicéridos (principalmente MG, y fracciones residuales de TG y DG), los cuales eluyeron de la columna gracias a la adición de 6 mL de hexano. A continuación, eluyeron los FFA gracias a la adición de 4 mL de hexano:acetato de etilo (90:10, v/v). El siguiente paso del método de Mateos et al (18) adiciona metanol para eluir los compuestos fenólicos. Sin embargo, se modificó esta etapa utilizando una solución de metanol:hidróxido de amonio (15 mL, 99,5:0,5, v/v) para conseguir una elución de los lípidos polares más completa, de acuerdo con el protocolo desarrollado por Carelli et al (19). Esta modificación fue necesaria puesto que se observó que la adición de metanol solo no era suficiente para conseguir una correcta elución de liso-PHT, aunque sí lo era para conseguir una elución efectiva de HT. Curiosamente, el modelo completo de Carelli et al (19), sin combinar con el método de Mateos et al (18) tampoco era útil para recuperar liso-PHT, aunque se comprobó que sí era efectivo para purificar liso-PL. Finalmente, los resultados indicaron que la combinación de los primeros pasos del método de Mateos et al (18) con el paso final del método de Carelli et al (19) eran necesarios para conseguir la mayor recuperación de liso-PHT. Tras la última etapa de purificación se obtuvo una fracción de lípidos polares que fue evaporada bajo corriente de N₂ a 40°C, y posteriormente re-disuelta en cloroformo: metanol (2:1, v/v) para su análisis. La fracción purificada de liso-PHT final tenía cerca de un 80% de pureza junto a cantidades residuales de FFA, MG y liso-PL.

Evaluación del efecto del proceso de digestión *in vitro* sobre la actividad antioxidante

Se llevó a cabo la medida de la capacidad antioxidante del PHT y del HT libre, antes y después de la digestión *in vitro*, mediante el test de DPPH. Para llevar a cabo este ensayo se tomaron alícuotas (50 µL) del medio de digestión conteniendo los compuestos a 0 y 60 min, y se disolvieron en etanol para alcanzar concentraciones entre 5-30 µg/mL de medio intestinal. La reacción comenzó con la adición de 1950 µL de una solución de DPPH en etanol (23,5 µg/mL). Las muestras se mantuvieron a T^a ambiente y en oscuridad durante 90 min, momento en el que se determinó la cantidad de DPPH residual que quedaba sin reaccionar midiendo la absorbancia a 517 nm. La cuantificación de DPPH sin reaccionar se realizó

mediante el uso de curvas de calibrado de DPPH. Los resultados de actividad antioxidante se expresaron como índice EC50, siendo este valor la concentración de HT (mM) requerida para alcanzar un 50% de reducción de la concentración de DPPH en relación a un DPPH control. Para poder interpretar los resultados obtenidos se llevaron a cabo además ensayos control del medio de digestión en ausencia de los compuestos del estudio.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito en capítulos anteriores.

6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1. Desarrollo de un modelo de digestión intestinal *in vitro* para Fosfolípidos

Es importante comentar que una de las principales dificultades que aparecieron durante la optimización y desarrollo del modelo de digestión *in vitro* de PL fue la imprecisión de datos con respecto a la digestión fisiológica *in vivo* de PL que se encontraba en la bibliografía. No se han podido encontrar resultados numéricos concretos en relación al grado de hidrólisis de estos compuestos a nivel intestinal, ni tampoco en relación a la cantidad de PLA₂ del contenido luminal, o en relación a la bioaccesibilidad de los productos de la hidrólisis de los PL (15). En base a todo ello, se consideraron como datos fisiológicos de referencia los datos generales publicados por Brogstom (15), donde se hace referencia a que los PL son absorbidos de manera eficiente una vez que han sido hidrolizados a liso-PL, gracias a la acción de la PLA₂, cuya concentración es suficientemente elevada para conseguir esa hidrólisis (15).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el modelo de digestión *in vitro* de partida utiliza como enzima digestiva la pancreatina. Para el caso concreto de los lípidos, la lipasa pancreática es la principal enzima que se encuentra en este extracto, la cual, aunque es capaz de hidrolizar parte de los PL, en realidad su

hidrólisis principal es llevada a cabo mayoritariamente por la PLA₂, una de las enzimas minoritarias de la secreción pancreática. Sin embargo, el producto comercial de pancreatina no especifica ni la presencia, ni el nivel exacto de PLA₂ de este preparado. Por lo tanto, una de las primeras evaluaciones que requirió el modelo de digestión fue determinar si era necesario un enriquecimiento del medio con la enzima PLA₂.

En la optimización del modelo de digestión, además, se intentó simular la co-existencia simultánea de una fracción lipídica de PL exógena procedente de la dieta junto con TG, así como la fracción lipídica de PL endógena procedente de la secreción biliar. Hay que señalar que establecer la composición final de cada una de estas fracciones lipídicas resultó complicado, debido a la gran variabilidad de datos que se pueden encontrar en la bibliografía científica en relación a la cantidad de PLs de la dieta, siendo este valor muy diferente según la ingesta (14). Así, en general, se ha descrito que la cantidad de PLs en la dieta puede variar desde un 1 hasta un 10% de la ingesta de grasa consumida (14). Teniendo en cuenta este rango, en el modelo de digestión se simuló una ingesta elevada de PL exógeno. En cuanto a la dosis de PL endógeno, este fue adicionado en un valor proporcional a la cantidad de SB y Cho del medio, de acuerdo a como tendría lugar en la secreción biliar.

Por otro lado, se llevó a cabo la preparación separada de las dos fracciones de PL descritas. Este aspecto fue considerado debido a que, de acuerdo con los datos fisiológicos del proceso de digestión, los PL exógenos de la dieta se encuentran mezclados con el resto de lípidos de la dieta (fundamentalmente TG), de tal manera que estos PL se localizan en la interfase de la gota lipídica de TG en el medio acuoso intestinal. Por el contrario, los PL endógenos de la secreción biliar se encuentran dispersos en el medio acuoso junto con las SB y Cho endógeno, en forma de agregados lamelares o de micelas mixtas. Por tanto, se consideró que esta diferente dispersión de los PL debería tenerse en cuenta y prepararse, por tanto, ambas fracciones de manera separada, intentando simular la pre-emulsión de los lípidos de la dieta, que posteriormente accederían al intestino para interactuar con la secreción biliar preformada e iniciarse así el proceso de digestión.

En la figura 2 se representa la evolución en el tiempo de la digestión *in vitro* de un PL de referencia junto con la fracción de TG en presencia de la pancreatina, como único extracto enzimático responsable de la hidrólisis. En la digestión se observó la eficacia de la pancreatina en la hidrólisis del TG, liberándose cantidades fisiológicas de los productos de la hidrólisis, con un 75% de TG degradado en los mayores productos de su hidrólisis, FFA y MG. Sin embargo, la hidrólisis del PL por acción de la pancreatina fue menor, liberándose niveles de liso-PL relativamente bajos, lo que sugirió que la pancreatina no tenía suficientes unidades de actividad de PLA₂ para alcanzar una digestión eficiente de PL. Este resultado llevó a la conclusión de que era necesario enriquecer la pancreatina con PLA₂ para poder alcanzar niveles fisiológicos en la hidrólisis de PL.

La dosis utilizada de PLA₂ para llevar a cabo la hidrólisis de PL en el modelo de digestión se basó en el criterio establecido por Brogstrom (15), por el cual la concentración de PLA₂ en el intestino correspondería con la cantidad suficiente de enzima capaz de hidrolizar completamente el PL a liso-PL. Se llevaron a cabo diferentes ensayos para evaluar con qué PLA₂ comercial se podía llegar a alcanzar un porcentaje de hidrólisis razonable y comparable con lo que se había observado que sucedía *in vivo*. Se probaron diferentes PLA₂ comerciales, de procedencia porcina y de procedencia fúngica, a diferentes concentraciones, para evaluar el grado de hidrólisis que podrían alcanzar (datos no mostrados). En base a estas pruebas preliminares, se decidió enriquecer el extracto de pancreática con PLA₂ fúngica, debido a que alcanzaba niveles de hidrólisis fisiológicos a proporciones de adición razonables (15).

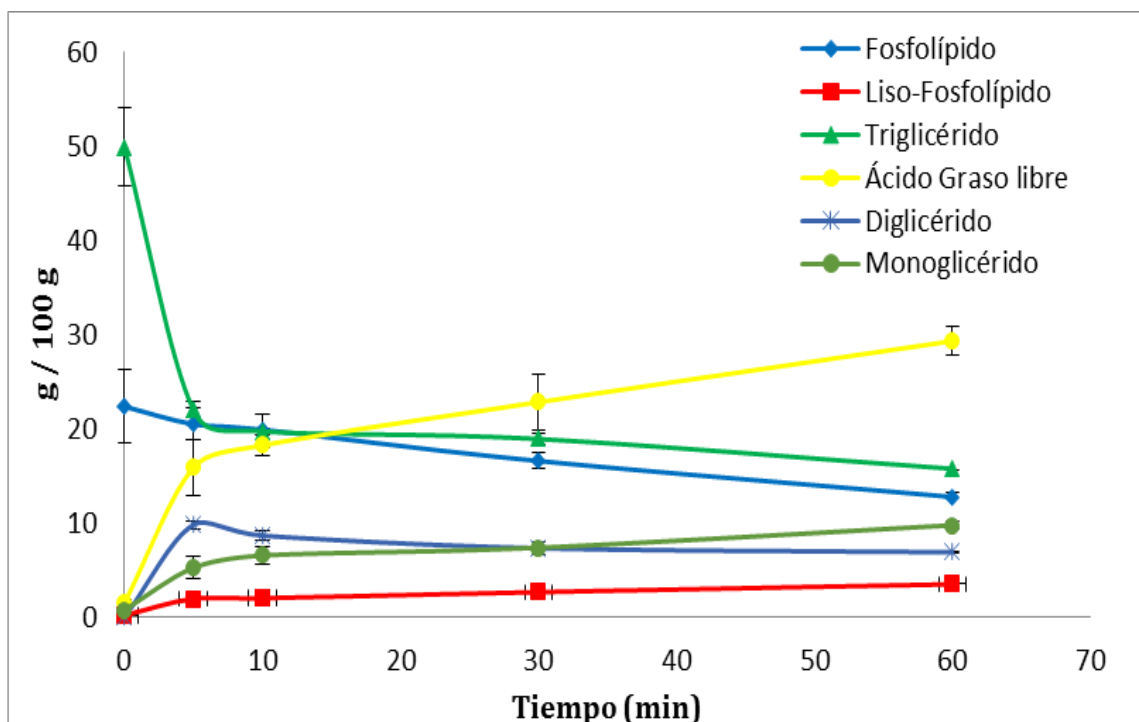


Figura 2. Evolución en el tiempo de los productos de digestión de PL y TG en ausencia de PLA₂

En la figura 3 se representa la evolución en el tiempo de la hidrólisis de PL en presencia de la PLA₂ seleccionada, donde se pudo observar que la digestión de PL era prácticamente completa, liberándose como producto mayoritario de la hidrólisis liso-PL. Además, se pudo observar que la hidrólisis por parte de la PLA₂ no afectaba a la hidrólisis del resto de lípidos del medio de digestión, manteniéndose un transcurso de la hidrólisis de TG similar a lo que se había observado en ausencia de PLA₂.

Por tanto, los resultados obtenidos tras la adaptación de las condiciones del medio indicaron que el modelo era capaz de reproducir resultados fisiológicos de digestión intestinal de PL, pudiendo ser utilizado como una herramienta útil para el estudio de la digestión del PHT.

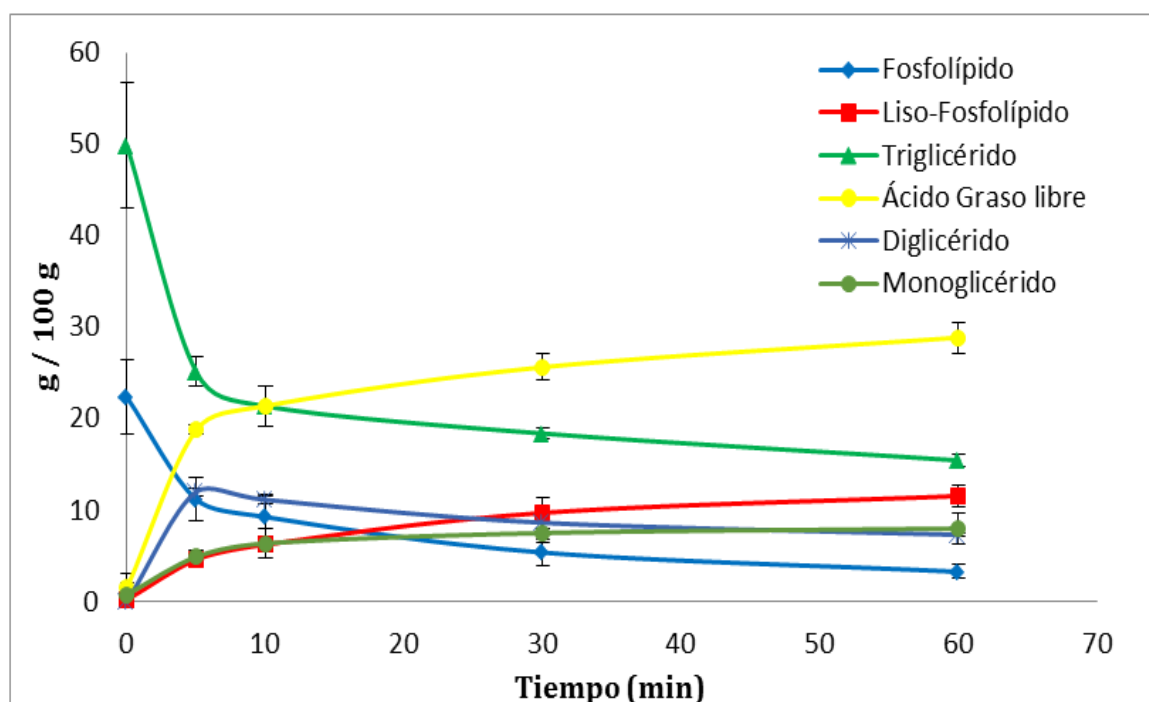


Figura 3. Evolución en el tiempo de los productos de digestión de PL y TG en presencia de PLA₂

6.4.2. Digestión intestinal *in vitro* de Fosfolípido esterificado con Hidroxitirosol

Para llevar a cabo esta digestión se reemplazó la fracción de PL procedente de la dieta (exógena) por el equivalente en PHT, manteniéndose la fracción de PL procedente de la secreción biliar (endógena) igual que en el modelo. De esta manera, el PHT co-existiría en el medio con el PL procedente de la secreción biliar durante el proceso de digestión.

En la figura 4 se representa la evolución en el tiempo de los productos de digestión del PHT, donde se puede observar una hidrólisis progresiva del sustrato inicial a liso-PHT. Es importante destacar que la velocidad de hidrólisis del PHT fue menor que la del PL de referencia (figura 3), alcanzándose a los 60 min de la reacción solamente un 50% de hidrólisis del PHT.

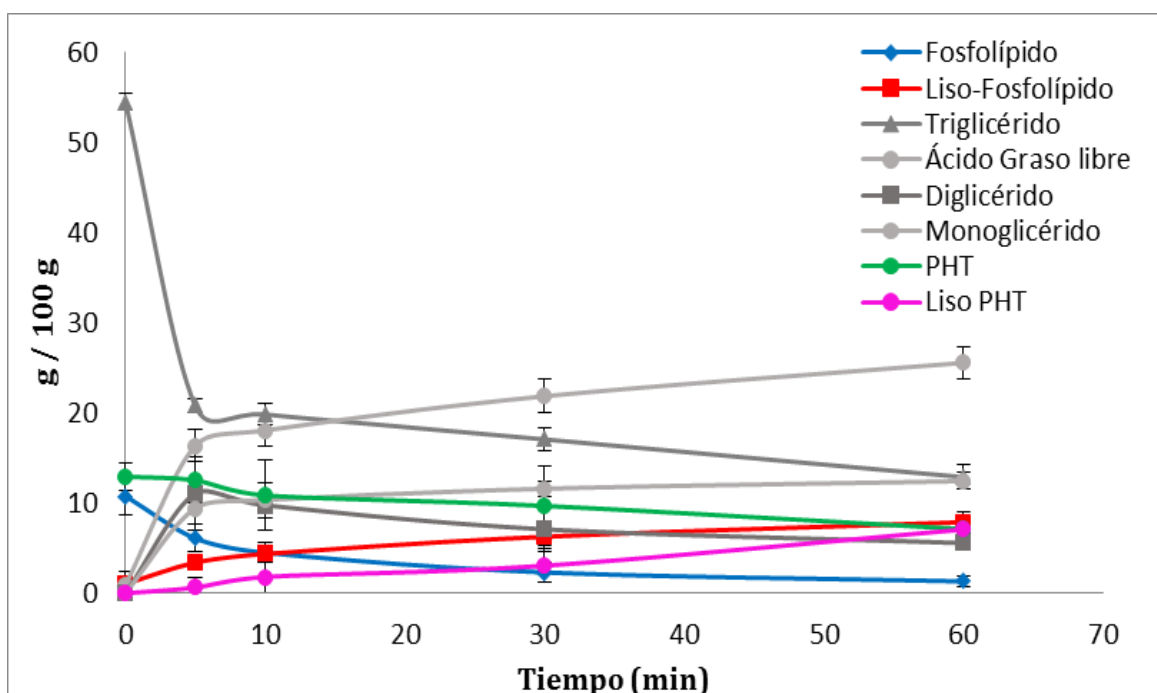


Figura 4. Evolución en el tiempo de los productos de digestión

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente obtenidos, y con el fin de estudiar con más detalle y en ausencia de cualquier otro fosfolípido, si la PLA₂ discriminaba frente a PHT, se realizaron dos pruebas: en una de ellas, la totalidad de fosfolípido del medio (tanto endógeno como exógeno) se adicionó en forma de PHT. En la otra, la totalidad de fosfolípido del medio se adicionó en forma de PL de referencia. A efectos comparativos, se tuvieron en cuenta los valores de liso-PL o liso-PHT que se liberaron durante la digestión.

En la figura 5 se puede observar la velocidad de las digestiones del PHT y del PL de referencia. Los resultados confirmaron que la digestión del PHT era más lenta que la del PL de referencia.

Justificar las diferencias en el grado y la velocidad de hidrólisis entre el PL de referencia y el PHT resulta complicado, debido a la falta de información en la bibliografía en relación a la hidrólisis de PL con modificaciones en la cabeza polar tan complejas, ya que se tratan de estructuras atípicas. Sin embargo, de manera general, se ha descrito la existencia de diferentes factores que podrían determinar la velocidad y el grado de hidrólisis enzimática de los PL.

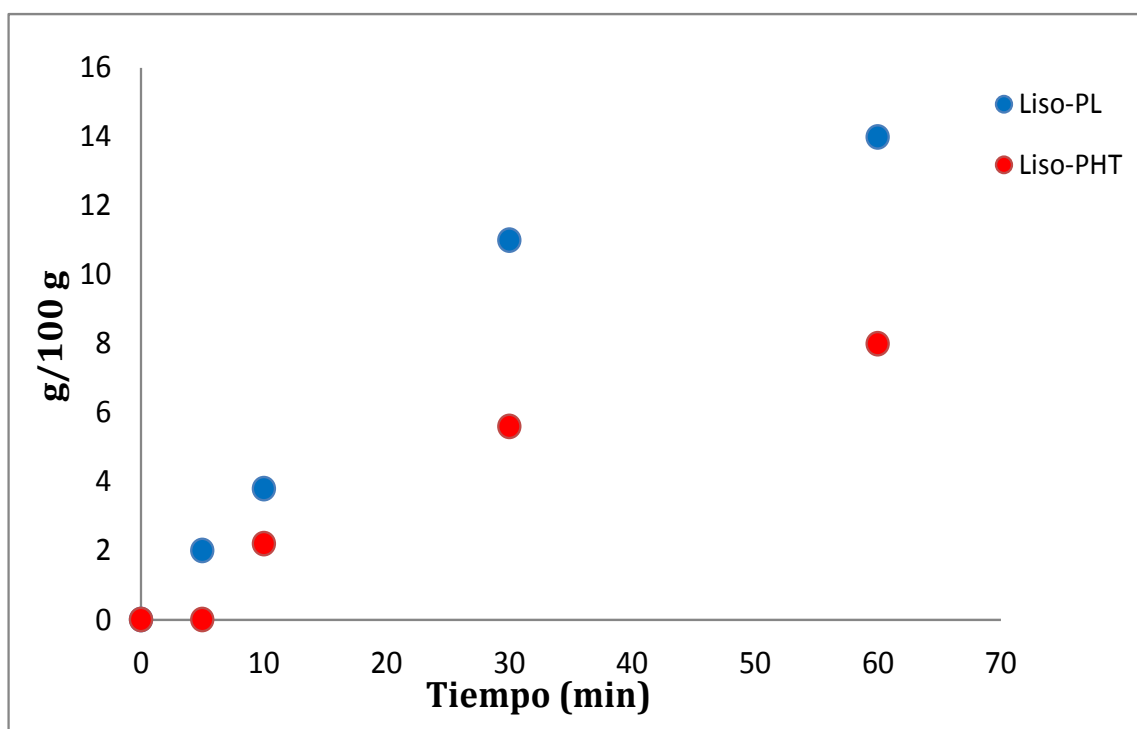


Figura 5. Cantidad de liso-PL y liso-PHT liberado en cada uno de los ensayos de hidrólisis, PL de referencia y PHT

En base a lo que se puede encontrar en la literatura científica, se ha observado que la agregación en forma de micelas mixtas, estructuras lamerales, liposomas o emulsiones de los PL, parece ser necesaria para facilitar la interacción del *sn*-2 FA éster con la región catalítica de la PLA₂ (20-22). Por otro lado, la presencia de otros lípidos en el medio de digestión podría influir en la forma de agregación, tanto de las cadenas de FA, como de la cabeza polar de los PL, alterando la acción de la PLA₂ (22). Estos factores podrían ayudar a tratar de explicar las diferencias en los resultados del grado y velocidad de hidrólisis entre los dos sustratos de estudio, PL y PHT. Por otro lado, de acuerdo con Scott et al (22), la molécula que se encuentre esterificada en la posición *sn*-3 del PL parece que afectaría a la afinidad de la PLA₂ por ese compuesto, ya que modifica la naturaleza del PL esterificado repercutiendo en las propiedades químicas y físicas del agregado que se forme, tales como la distribución de la carga superficial o el propio estado de agregación. En relación a estas propiedades, es importante destacar que el PL de referencia y el PHT podrían tener una carga neta diferente, debido a que el PL de referencia tendría una carga neta neutra (zwitterión),

mientras que el PHT sería un PL con carga negativa, debido al remplazamiento de la colina por HT.

En este sentido, y con el fin de indagar en el diferente estado de agregación de los sustratos en el medio de digestión, se determinó el número de estructuras micelares formadas a los 60 min de reacción. Se pudo observar que durante la digestión del PHT se había formado un menor número de estructuras micelares al final de la digestión, en comparación con la digestión del PL de referencia (figura 6). A su vez este resultado pareció estar correlacionado con el grado de hidrólisis del PHT, es decir, la menor digestión del PHT llevó a una menor formación de estructuras micelares en el medio de digestión.

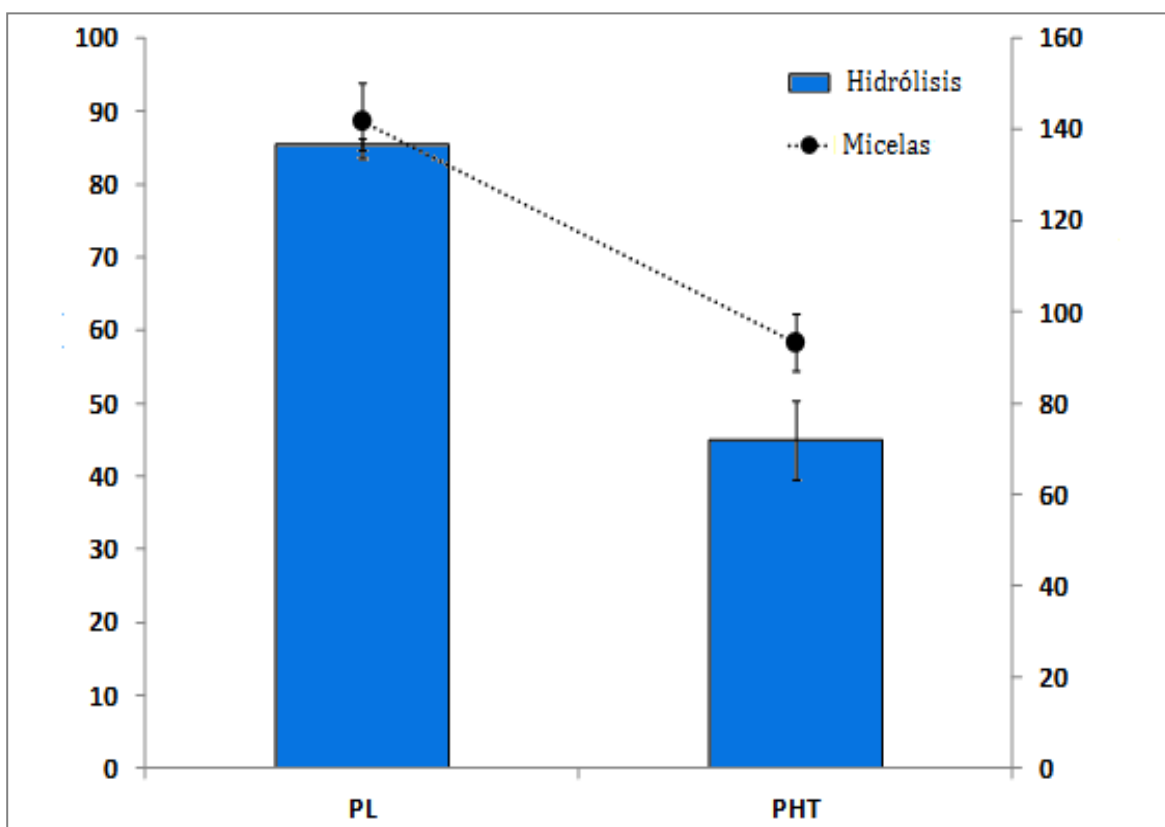


Figura 6. Grado de hidrólisis y número de estructuras micelares a los 60 min de digestión del PL de referencia y del PHT.

6.4.3. Bioaccesibilidad del Fosfolípido esterificado con Hidroxitirosol

En base a los resultados que se representan en la figura 7, la mayoría de los productos de la hidrólisis, tanto lípidos neutros como polares, se encontraban principalmente formando parte de la MP, sugiriendo una elevada bioaccesibilidad. Por tanto, el vehículo desarrollado tendría una bioaccesibilidad comparable a la de un PL de referencia.

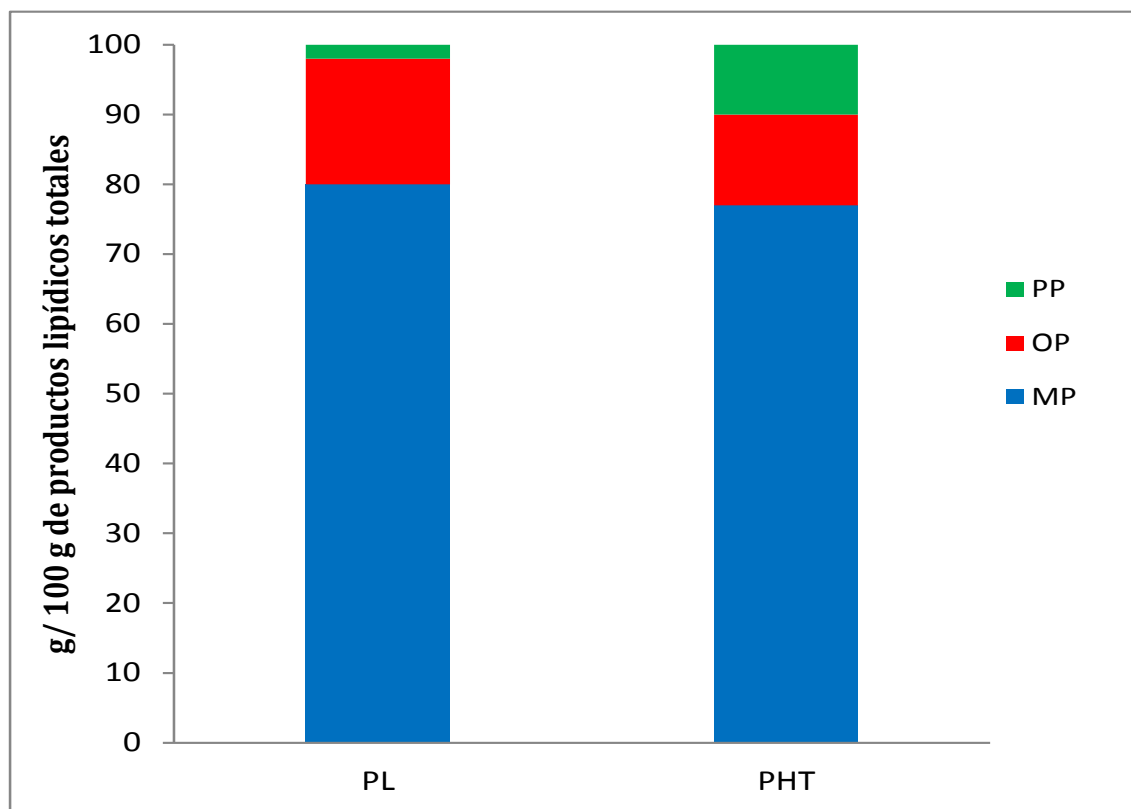


Figura 7. Distribución de los productos lipídicos en las distintas fases del medio de digestión para cada uno de los sustratos, PL de referencia y PHT.

Independientemente de la similitud entre las MP, se observaron ciertas diferencias en cuanto al resto de fases del medio. Comparando la cantidad de lípidos en la OP y en la PP de cada uno de los sustratos de estudio, se observó que la OP en el caso del PL de referencia era ligeramente mayor en comparación con el PHT (16% de OP para el PL respecto al 12% de OP para el PHT), mientras que la PP del PL de referencia era minoritaria con respecto a la obtenida en el caso del PHT (4% de PP para el PL de referencia respecto frente al 9% de PP para el PHT).

Con el fin de indagar en estas diferencias, a continuación se representan detalladamente las distribuciones específicas de las distintas especies lipídicas en cada una de las fases del medio de digestión.

En la figura 8 se representan los resultados de la distribución en fases de los productos de digestión del PL de referencia, donde se observó que los productos polares liberados de la hidrólisis del PL, liso-PL y PL residual, se encontraban totalmente incluidos en la MP, sugiriendo una elevada bioaccesibilidad de estos compuestos. Estos resultados estaban en concordancia con lo que se había observado que podría suceder de manera fisiológica (15) tras la digestión de los PL a nivel intestinal, validando por tanto a su vez el modelo de digestión intestinal *in vitro*.

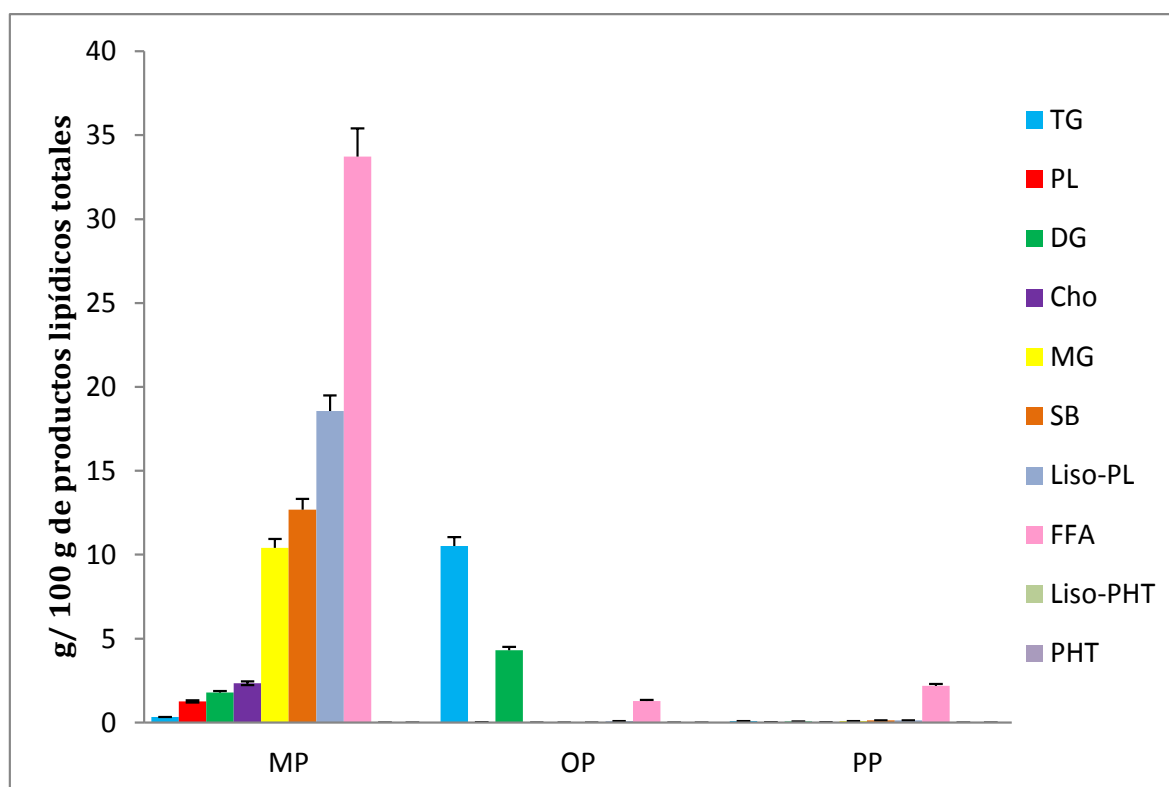


Figura 8. Distribución de los productos lipídicos en cada fase del medio de digestión para el PL de referencia

Por otro lado, en la figura 9 se representan los resultados de la distribución de fases de los productos de la hidrólisis del PHT, donde se pudo observar que prácticamente la mayoría de los lípidos polares, liso-PHT y PHT residual, procedentes de la hidrólisis del PHT, se encontraban en la MP, sugiriendo una elevada bioaccesibilidad de ambos productos, aunque con ciertas diferencias respecto al PL de referencia.

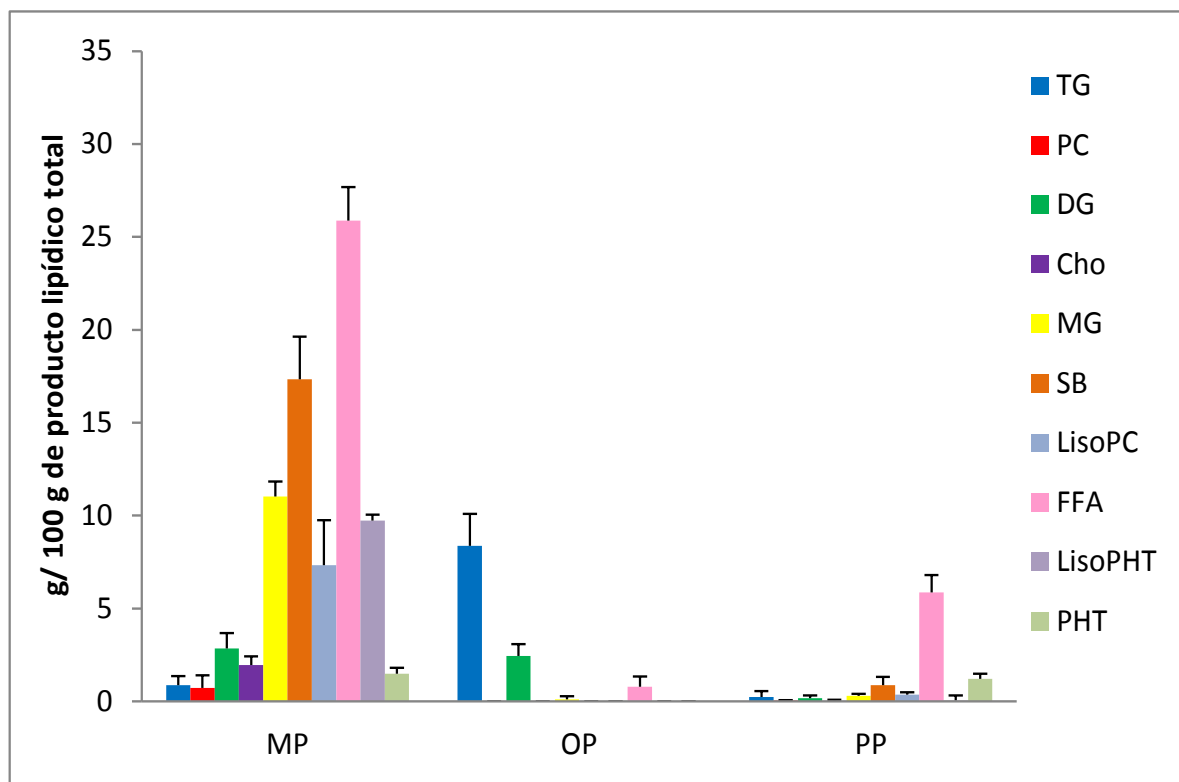


Figura 9. Distribución de los productos lipídicos en cada fase del medio de digestión para el PHT.

Por un lado, la bioaccesibilidad del FFA cambió de un 92% en el caso del PL de referencia a un 80% en el caso del PHT, debido a que una parte de FFA se encontró precipitada en la fase PP en el caso de la digestión de PHT. Igualmente, en el caso del PHT, se observó una menor bioaccesibilidad del mismo en relación al PL de referencia, encontrándose cierta cantidad de PHT precipitado en la PP. En general, se ha observado en la literatura científica que la precipitación de FFA durante la digestión intestinal podría estar relacionada, por un lado, con una limitación en la inclusión de los productos en las estructuras micelares y, por otro lado, con la formación de jabones de calcio que tienden a precipitar (23). En el caso

concreto de este estudio, los FFA que esterificaban ambos PL eran los mismos, con lo que las diferencias observadas no tendrían por qué estar relacionadas con esta hipótesis. Teniendo en cuenta que los productos de la digestión del PHT formaban una cantidad menor de estructuras micelares al final de la digestión con respecto al PL de referencia (figura 6), y que en la composición de la PP se observó una precipitación de PHT junto al FFA, se podría plantear la hipótesis de que el PHT podría tener una menor capacidad emulsionante en comparación con el PL de referencia, lo que provocaría una disminución de la bioaccesibilidad de determinados FFA, así como una peor bioaccesibilidad del propio PHT en comparación con PLs habituales.

6.4.4. Bioaccesibilidad de HT.

Teniendo en cuenta los resultados observados en el apartado anterior, se consideró relevante evaluar la capacidad y magnitud del PHT como potencial vehículo lipídico del HT. Para ello, se llevó a cabo un estudio comparativo de la bioaccesibilidad del HT vehiculizado de dos maneras diferentes, 1) esterificado en forma de PHT, y 2) sin esterificar (HT libre), pero co-existiendo con fosfolípidos. De este modo, se intentó indagar cómo afectaría a la bioaccesibilidad del HT, la propia estructura de PL en el medio de digestión, incorporado de un modo u otro (libre en el medio o químicamente unido a HT). En tercer lugar, se llevaron a cabo digestiones de HT en presencia únicamente de TG (sin adición de PL exógenos de la dieta). En todos los casos, se mantuvo la fracción de PL endógeno correspondiente a la secreción biliar.

De acuerdo con los resultados representados en la figura 10, la mayoría del HT se encontraba en la MP en las tres formas de estudio, sugiriendo una elevada bioaccesibilidad en los tres casos.

Sin embargo, se observaron diferencias en la distribución entre las fases de los tres modos de administración del HT planteados. Por un lado, la cantidad de HT en la MP procedente de la digestión del PHT era significativamente superior a la observada en las otras dos formas de administración, debido principalmente a que

en la OP de la digestión del PHT no se detectó nada de HT, a diferencia del resto de formas de preparación de HT. Este resultado podría indicar que una determinada parte del HT, administrado de manera libre o pre-mezclado con un PL, podría ser más difícilmente dispersado en la MP en comparación con el PHT, tendiendo a permanecer en la OP. Probablemente esto podría ser debido a las propiedades anfífilas del PHT debido a su estructura de PL, lo que podría permitir una mejor dispersión del PHT en la fase acuosa del medio en comparación con el HT, e indirectamente, una mejor dispersión del HT vehiculado.

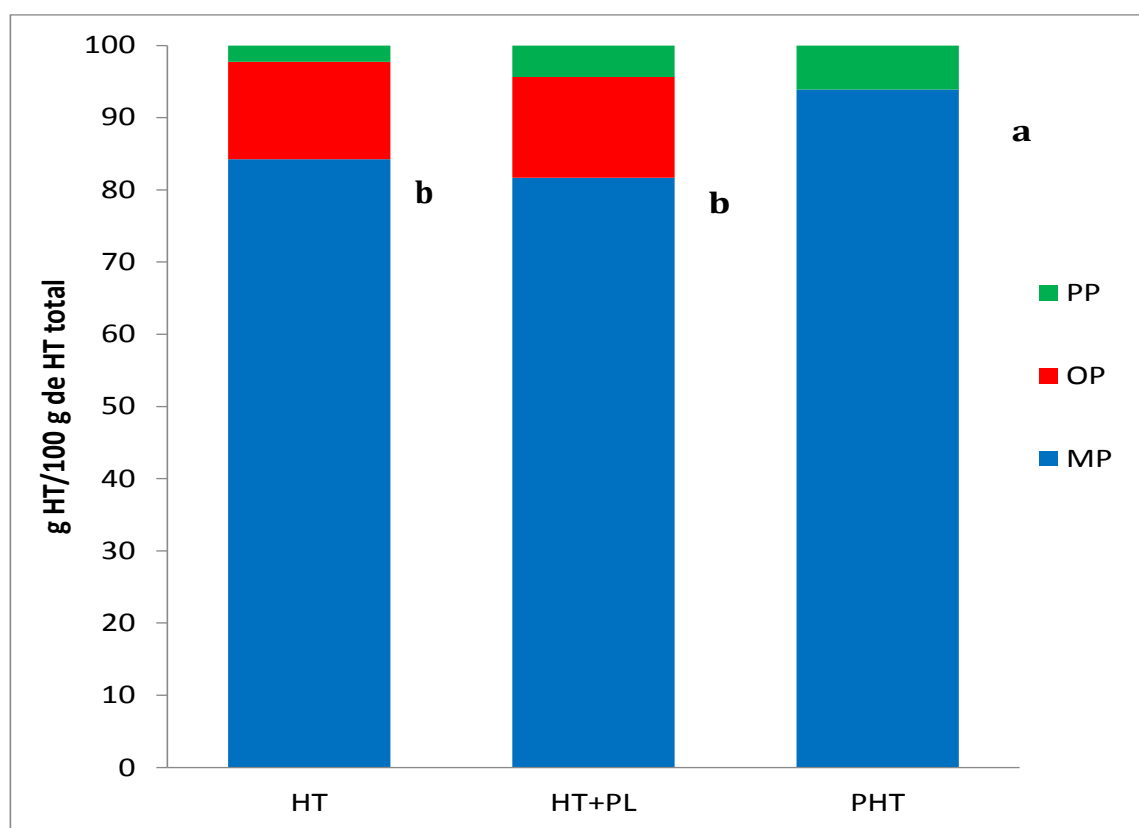


Figura 10. Distribución del HT entre las tres fases del medio de digestión en cada uno de los modos de administración planteados, HT libre, HT+PL dieta y PHT

Por lo tanto, los resultados obtenidos contribuyeron a la valoración del potencial de la molécula PHT como vehículo de HT, así como al estudio del comportamiento general del HT libre durante el proceso digestivo en presencia de lípidos.

6.4.5. Evaluación del efecto de la digestión *in vitro* en la actividad antioxidante del Fosfatidilhidroxitirosol.

Recientemente, miembros del grupo de investigación IAF-UAM han llevado a cabo un completo estudio sobre la potencial actividad antioxidante del PHT en diversas matrices lipídicas, observándose una actividad comparable o superior a la del HT en algunas de estas matrices (24). Teniendo en cuenta estas evidencias científicas sobre la capacidad antioxidante del PHT, en el presente capítulo se consideró de interés llevar a cabo un estudio sobre la influencia del proceso de digestión intestinal en el efecto antioxidante del PHT. Este planteamiento se basó observando los datos bibliográficos en los que se ha descrito que la actividad antioxidante de determinados compuestos fenólicos puede resultar modificada tras la digestión gastrointestinal de los mismos, como observaron Pereira-Caro et al (16). Estos autores describieron la estabilidad oxidativa de productos antioxidantes del aceite de oliva virgen, HT e HT-acetato, después de ser digeridos en condiciones *in vitro*. Wootton-Beard et al (17) estudiaron la capacidad antioxidante de diferentes zumos de vegetales antes y después de su digestión *in vitro*, observando que determinados compuestos veían mejorada su capacidad antioxidante, mientras otros compuestos empeoraban, tras la digestión *in vitro* (17). Estos resultados indican la importancia de desarrollar vehículos de compuestos bioactivos que puedan proteger la actividad de los mismos durante el proceso de digestión gastrointestinal y la importancia de evaluar la actividad antioxidante de un determinado compuesto fenólico después de su digestión.

En la figura 11 se representan los resultados obtenidos de la medida de la actividad antioxidante del medio intestinal en presencia de HT libre o de PHT, antes y después de la digestión. Tal y como se puede observar, el HT libre no se vio afectado por el proceso de digestión intestinal, mostrando la misma actividad antioxidante, antes y después de la misma. Comparando los resultados con el PHT, el HT libre presentaba una mayor actividad antioxidante, tanto antes como después de la digestión intestinal. Con lo cual, independientemente del momento de digestión, el HT mostró ser un antioxidante más efectivo en el medio intestinal que el vehículo de síntesis PHT. Sin embargo, en el caso particular del PHT, se observó que el valor de EC50 del PHT digerido fue significativamente menor que el observado para el PHT sin digerir, lo cual podría indicar que los productos de la hidrólisis del PHT, presumiblemente el mayoritario, liso-PHT, podrían presentar una capacidad antioxidante mayor que la del PHT. Este resultado se puede considerar razonable, teniendo en cuenta que el liso-PHT sería una molécula más hidrofílica y de menor tamaño que el PHT, pudiendo favorecer su efecto sobre el radical DPPH.

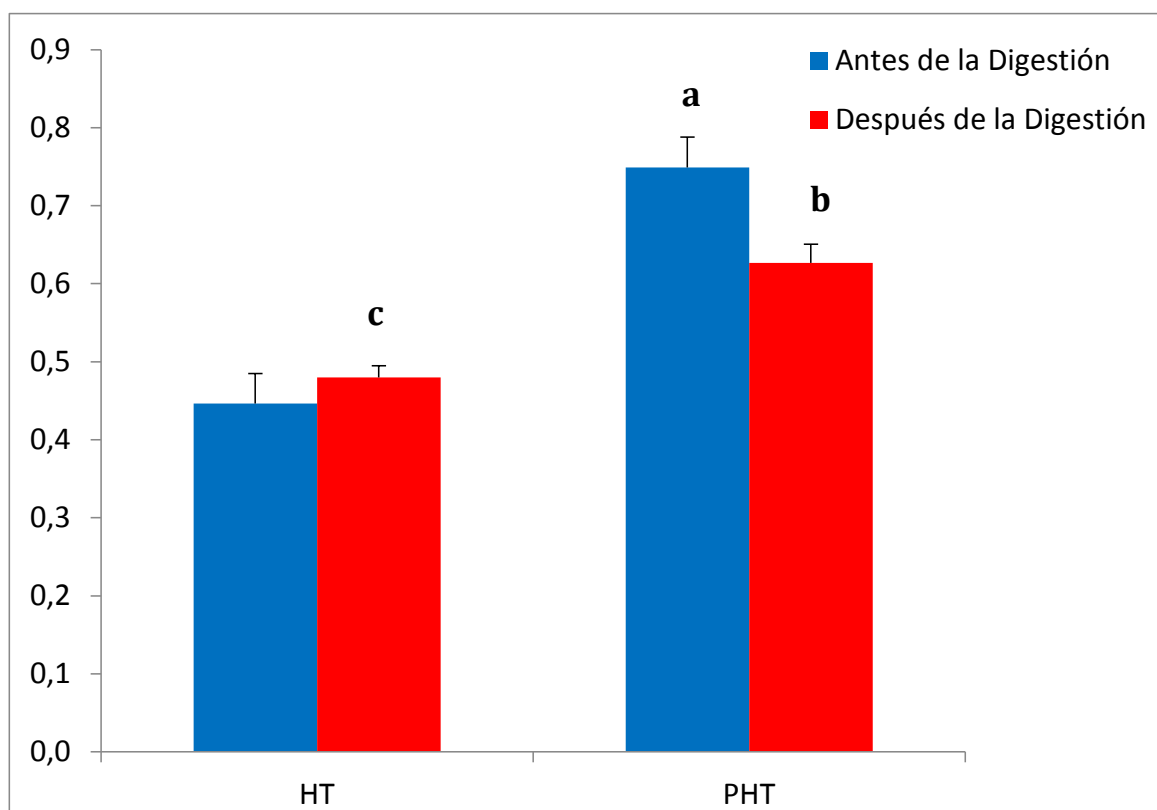


Figura 11. Capacidad antioxidante del HT libre y del PHT antes y después de la digestión, representando los valores de EC50 en cada caso.

6.5. CONCLUSIONES

Se desarrolló un modelo de digestión intestinal *in vitro* para digerir PLs, capaz de proporcionar resultados fisiológicos. La aplicación de este modelo de digestión en el estudio del producto de síntesis PHT permitió concluir que este derivado es reconocido por la PLA₂ durante la simulación del proceso de digestión intestinal *in vitro*, aunque de una manera menos eficiente que un PL de referencia.

Por otro lado, el producto mayoritario de la hidrólisis del PHT, el liso-PHT, junto con la mayoría del PHT no digerido, mostraron una buena bioaccesibilidad, similar a la de un PL de referencia, siendo por tanto la mayoría del HT vehiculado bioaccesible.

Finalmente, el PHT digerido mostró una capacidad antioxidante superior al PHT sin digerir, indicando un potencial efecto bioactivo de la forma liso-PHT superior a la forma no hidrolizada.

No obstante, sería necesaria una mayor evaluación de la potencial bioactividad del PHT y de sus productos de hidrólisis con estudios más concretos en condiciones *in vivo*, para poder validar la vehiculización del HT en forma de PL.

6.6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cornwell D G, Ma J. (2008) Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 8774-8786.
- (2) Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. (2010) Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Review*, 68, 191-206.
- (3) Killeen MJ, Pontoniere P, Crea R. (2011) Hydroxytyrosol. An examination of its potential role in cardiovascular disease, inflammation, and longevity. *AgroFood Industry Hi-Tech*, 22, 16-29
- (4) D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, et al. (2001) Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 1492-1498.

- (5) De la Torre R. Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. (2008) *Inflammopharmacology*, 16, 245-247.
- (6) Rubió L, Macià A, Castell-Auví A, Pinent M, Blay MT, Ardevol A, et al. (2014) Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models. *Food Chemistry*, 149, 277-284.
- (7) Grasso S, Siracusa L, Spatafora C, Renis M, Tringali C. (2007) Hydroxytyrosol lipophilic analogues: Enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorganic Chemistry*, 35, 37-52.
- (8) Torres de Pinedo A, Peñalver P, Rondón D, Morales JC. (2005) Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure. *Tetrahedron*, 61, 7654-7660.
- (9) Trujillo M, Mateos R, Collantes de Teran L, Espartero JL, Cert R, Jover M, et al. (2006) Lipophilic hydroxytyrosyl esters. Antioxidant activity in lipid matrices and biological systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 3779-3785.
- (10) Laguerre M, López Giraldo LJ, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Baréa B, Weiss J, et al. (2010) Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of “phenolipids” in emulsion: a parabolic effect of the chain length of rosmarinate esters. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58, 2869-2876.
- (11) Madrona A, Pereira-Caro G, Mateos R, Rodríguez G, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, et al. (2009) Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters. *Molecules*, 14, 1762-1772.
- (12) Pereira-Caro G, Mateos R, Traka MH, Bacon JR, Bongaerts R, Sarriá B, et al (2013) Hydroxytyrosyl ethyl ether exhibits stronger intestinal anticarcinogenic potency and effects on transcript profiles compared to hydroxytyrosol. *Food Chemistry*, 138, 1172-1182.

- (13) Casado V, Reglero G, Torres CF. (2014) Novel and efficient solid to solid transphosphatidylation of two phenylalkanols in a biphasic GRAS medium. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 99, 14-19.
- (14) Espinosa-Salinas I, Rodriguez-Casado A, Molina S, Rodriguez-Gonzalez A, Ordovas JM, Ramirez de Molina A. (2011) Beneficial effects of bioactive phospholipids: genomic bases. *Current Nutrition and Food Science*, 7, 145-154.
- (15) Borgström B. Luminal digestion of fats. In: Go VLW, Dimagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA, editors. (1993) The pancreas: biology, pathobiology, and disease, *New York: Raven Press*, 475-488.
- (16) Pereira-Caro G, Sarriá B, Madrona A, Espartero JL, Escuderos ME, Bravo L, et al. (2012) Digestive stability of hydroxytyrosol, hydroxytyrosyl acetate and alkyl hydroxytyrosyl ethers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63, 703-707.
- (17) Peter C. Wootton-Beard, Aisling Moran, Lisa Ryan (2011) Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods, *Food Research International*, 44, 217-224
- (18) Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Rios JJ, León-Camacho M, Alcudia F, et al. (2001) Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 2185-2192.
- (19) Carelli AA, Brevedan MI, Crapiste GH. (1997) Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 74, 511-514.
- (20) Dijkstra BW, Drenth J, Kalk KH. (1981) Active site and catalytic mechanism of phospholipase A₂. *Nature*, 289, 604-606.
- (21) Scott DL, White SP, Otwinowski Z, Yuan W, Gelb MH, Sigler PB. (1990) Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science*, 250, 1541-1546.

(22) Carey MC, Small DM, Bliss CM. (1983) Lipid digestion and absorption. *Annual Review of Physical Chemistry*, 45, 651-677.

(23) Cohn JS, Kamili A, Wat E, Chung RW, Tandy S. (2010) Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. *Nutrients*, 2, 116-127.

(24) Martin D, Garcia-Serrano A, Casado V, Vázquez L, Reglero G, Torres CF. (2014) Antioxidant activity of phosphatidyl derivatives of hydroxytyrosol in edible oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, in press, DOI: 10.1002/ejlt.201400053

CAPÍTULO VII

CAPÍTULO VII: “DISCUSIÓN CONJUNTA”

7.1. DESARROLLO DE MODELOS DE DIGESTIÓN *IN VITRO* PARA DIFERENTES SUSTRATOS LIPÍDICOS

A lo largo de la presente Tesis se han ido explicando los diferentes cambios que han tenido que ser llevados a cabo a partir de un modelo de digestión intestinal *in vitro* de partida para poder llegar a obtener un modelo que reprodujera resultados similares a los descritos en estudios *in vivo* para cada uno de los diferentes sustratos lipídicos de estudio, es decir, acilgliceroles, alquilgliceroles, ésteres de fitosterol o fosfolípidos. Todo ello con la finalidad de poder aplicar estos modelos posteriormente en la evaluación del proceso digestivo de especies lipídicas nuevas de síntesis, como son alquilgliceroles esterificados con ácido butírico, fitosteroles esterificados con CLA o fosfolípidos esterificados con HT en su cabeza polar; así como otras especies lipídicas de interés bioactivo y/o tecnológico como son los glicéridos parciales. Para todos ellos se ha hecho hincapié en la importancia de partir previamente de modelos que hubieran sido validados frente a las formas lipídicas análogas habituales.

Sin embargo, como se ha ido mostrando a lo largo de los capítulos anteriores, no es frecuente encontrar modelos de digestión *in vitro* estándar para cualquier sustrato lipídico, por lo que es necesario adaptar los modelos de digestión al sustrato que se pretende estudiar, sobre todo cuando se tratan de especies lipídicas específicas. Las adaptaciones llevadas a cabo en cada modelo fueron necesarias debido, por una lado, a que lo que principalmente se encuentra descrito en la bibliografía son modelos de digestión *in vitro* para TG, no siendo aplicables a otras especies lipídicas. Por otro lado, como ya se comentó en el Capítulo I, muchos de estos modelos descritos en la bibliografía presentan la problemática de mostrar una gran variabilidad en cuanto a las condiciones del proceso aplicadas, en algunos casos incluso muy alejadas de condiciones fisiológicas, lo que hizo por tanto necesario un esfuerzo previo de desarrollar un modelo que reprodujera resultados lo más fisiológicos posibles para la forma más habitual de lípidos, los TG. Sobre este modelo desarrollado y validado, sería sobre el que posteriormente se irían

haciendo las correspondientes modificaciones para adaptarlo a otras especies como ésteres de fitosterol o fosfolípidos, tal y como se ha ido mostrando en los capítulos anteriores.

En base a este razonamiento, la memoria de la Tesis se encuentra estructurada en función de los diferentes grupos lipídicos que se han estudiado: acilgliceroles y alquilgliceroles, ésteres de fitosterol y fosfolípidos. No obstante, es importante señalar que la cronología de las actividades experimentales de la Tesis evolucionaron en un orden diferente al orden de presentación de la memoria descrita. En concreto, cronológicamente se realizaron primero los estudios descritos en el Capítulo III, seguido de los estudios del Capítulo V, siendo las actividades del Capítulo IV y del Capítulo VI las últimas llevadas a cabo. Esta es la razón por la cual los modelos descritos en los Capítulos IV y VI son los más complejos de todos, debido a que el modelo de digestión *in vitro* que se desarrolló en el Capítulo III ha ido modificándose y evolucionando progresivamente en este mismo orden (III, V, IV y VI), a lo largo de las actividades experimentales llevadas a cabo en esta Tesis. Por tanto, con el fin de entender cómo ha ido evolucionando el modelo de digestión a lo largo de la presente Tesis, y poder comprender cada una de las adaptaciones particulares que han sido necesarias para cada sustrato lipídico, a lo largo de los siguientes apartados se realizará una discusión conjunta de los cambios más relevantes realizados sobre el modelo en cada uno de los capítulos, especialmente a la hora de realizar la adaptación del modelo desde un uso para acilgliceroles (TG), a su aplicación a formas lipídicas diferentes como PS o PL

Además, hay que recordar que a lo largo de los distintos capítulos, no sólo han sido necesarias modificaciones sobre el propio modelo de digestión, sino que en algunos casos los procedimientos posteriores de extracción lipídica de las muestras o análisis instrumental, también han ido requiriendo adaptaciones para cada especie lipídica. Igualmente estos cambios serán discutidos conjuntamente en los siguientes apartados.

7.1.1. Modificaciones del modelo de digestión *in vitro*

Tipo de enzima y relación enzima/sustrato

Comenzando con el desarrollo del modelo para TG, uno de los principales aspectos iniciales a considerar fue el tipo de enzima a utilizar y la relación enzima/sustrato más adecuada. Como fue razonado en el Capítulo III, en los modelos de digestión *in vitro* desarrollados en la presente Tesis, tanto para acilgliceroles, alquilgliceroles, PS y PL se utilizó la pancreatina como principal fuente de enzimas lipolíticas. Esto fue debido a que al tratarse de un extracto del páncreas (1), contiene no sólo lipasa pancreática, sino también el cofactor de esta, la co-lipasa, así como, presumiblemente, otras enzimas que podrían ser de interés para la digestión de otras especies lipídicas, como la colesterol esterasa para el caso de los PS y la PLA₂ para el caso de los PLs, en el mismo producto. Sin embargo, como se pudo comprobar en los correspondientes capítulos, la pancreatina no fue suficiente como única fuente enzimática para llevar a cabo una digestión fisiológica de PS y PLs, con lo cual para ambos casos fue necesario realizar un enriquecimiento del medio con colesterol esterasa y PLA₂, respectivamente.

En cuanto a los niveles de todas las enzimas utilizadas, para todas ellas se aplicó el mismo criterio de adición de una cantidad suficiente, y siempre dentro de un rango razonable a los descritos *in vivo*, que permitiera alcanzar un grado de hidrólisis similar a los descritos *in vivo* (2).

Simulación de una situación de “fed state” y coingesta lipídica

Otra de las adaptaciones que requirió el modelo inicial de digestión fue la adaptación a condiciones que simularan una ingesta de alimentos (“fed state”), para lo cual fue necesario llevar a cabo varios cambios en el modelo inicial.

Por un lado, fue necesaria la incorporación de la proporción adecuada de SB y PL que simularan adecuadamente la secreción biliar durante la digestión de

alimentos. Este cambio se practicó en la primera adaptación del modelo a TG ya en el Capítulo III y se mantuvo igualmente para PS y PL.

Por otro lado, la simulación de una situación de “fed state” llevó a la necesidad de tener que incorporar para varias formas lipídicas lo que se denominó como “lípidos de acompañamiento”. Este aspecto se razonó teniendo en cuenta que especies lipídicas minoritarias de la dieta, como pueden ser PS o PL, habitualmente forman parte de una fracción lipídica mayoritaria principal (TG), por lo que lo razonable sería simular su proceso de digestión co-existiendo en el medio con esta forma mayoritaria. Por otro lado, se ha observado en diferentes estudios de la bibliografía que la digestión de estas especies lipídicas minoritarias, suelen ver facilitado su proceso de digestión y absorción por la co-existencia con otros lípidos en el medio (3-5).

Por tanto, en base a estos razonamientos, para el desarrollo de modelos de digestión de PS y PL, se determinó que era necesario adicionar una cantidad determinada de TG como “lípidos de acompañamiento”.

Por otro lado, hay que señalar que a la hora de llevar a cabo la digestión de especies de alquilglicerol en el Capítulo III, no existía información previa al respecto de la influencia de otros lípidos en el proceso de digestión de estos lípidos minoritarios, por lo que se llevó a cabo el estudio inicialmente digiriendo los sustratos de alquilglicerol sin la coexistencia de ningún otro lípido en el medio. Cuando posteriormente se estableció una comparativa con el proceso de digestión de alquilglicerol en presencia del “lípidos de acompañamiento” en forma de TG, se comprobó que igualmente en el caso de este sustrato se veía mejorada la bioaccesibilidad de los productos de digestión (Capítulo III, figura 7). Con lo cual, se concluyó que para esta especie lipídica, la coexistencia de un “lípidos de acompañamiento” en el proceso de digestión, simulando una situación de coingesta con otros lípidos de la dieta mejora significativamente su bioaccesibilidad. En cualquier caso, el modelo de digestión utilizado inicialmente, “fasted state”, podría ser también perfectamente válido para un nutraceutico que se toma sin ir acompañado de alimento.

Pre-emulsión del medio de digestión y simulación de la fracción lipídica exógena y endógena

Los compuestos lipídicos para poder ser digeridos es necesario que se encuentren emulsionados en el medio de digestión (6, 7-9), como ya se explicó en el Capítulo I. En base a ello, cuando se inició el desarrollo del primer modelo de digestión para acilglicerolos en el Capítulo III se consideró necesario pre-emulsionar los lípidos del medio de digestión antes de adicionar la lipasa pancreática. Igualmente, este procedimiento fue llevado a cabo en el estudio posterior con PS (Capítulo V).

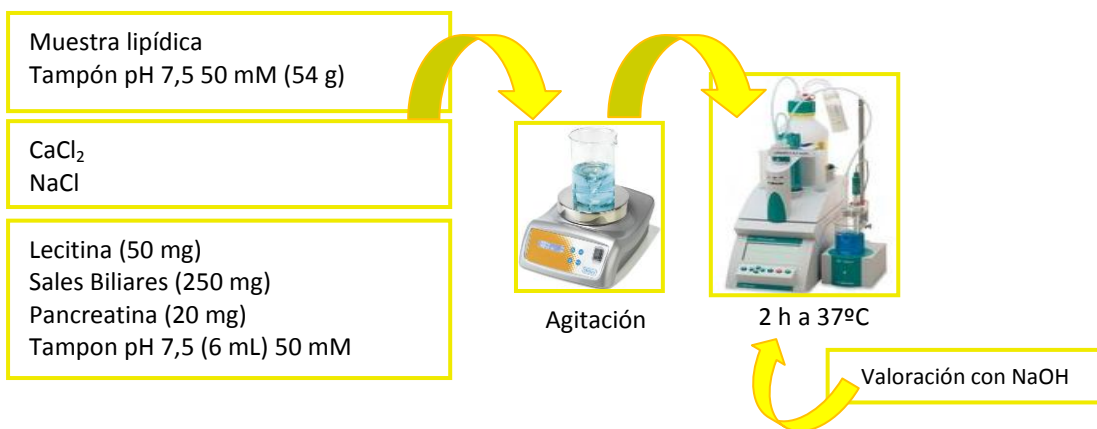
Sin embargo, a medida que se fue avanzando en la complejidad del modelo de digestión, esta etapa de pre-emulsión fue también nuevamente modificada. La base de los cambios se planteó cuando se quiso llevar a cabo el desarrollo de un modelo de digestión para PL, donde surgió la problemática de tener que adicionar tanto PLs exógenos de la dieta como PLs endógenos de la secreción biliar. Se consideró que la diferente dispersión de los PLs de las distintas fracciones debería prepararse de manera separada, intentando simular la pre-emulsión de los lípidos de la dieta, que posteriormente accederían al intestino para interaccionar con la secreción biliar preformada e iniciarse así el proceso de digestión (9).

Esta modificación llevada a cabo para el desarrollo del modelo de digestión de PL se consideró más próxima a condiciones fisiológicas, con lo cual se mantuvo también en el resto de estudios posteriores llevados a cabo, como fue el proceso de digestión de glicéridos parciales, tal y como fue comentado en el capítulo IV de la presente Tesis.

Además de todos estos cambios principales que fue necesario aplicar para poder llevar a cabo la adaptación del modelo de TG a otras especies lipídicas, es importante recordar que el propio modelo de digestión de TG inicial requirió su modificación previa en cuanto a otros aspectos ya discutidos con detalle en el Capítulo III y IV. En concreto, se llevó a cabo la evaluación de la forma de preparación del extracto de pancreatina, el establecimiento del tiempo final de digestión, o la indagación en el problema de acilmigración del modelo, que llevó a la eliminación de soluciones básicas como herramienta de control del pH, siendo necesario un incremento de la fuerza iónica del tampón de digestión en su lugar.

Finalmente, una vez que se han comentado detalladamente los principales cambios llevados a cabo para cada uno de los modelos desarrollados, y cómo ha ido evolucionando progresivamente el modelo de digestión, se ha querido ilustrar de manera más visual cómo era el modelo de digestión inicial y cómo es actualmente el modelo de digestión final que se ha llegado a desarrollar con la conclusión de la presente Tesis (figura 2). En rojo se muestran los principales parámetros modificados.

a. Modelo de digestión *in vitro* inicial



b. Modelo de digestión *in vitro* final

a) Fracción exógena

Muestra lipídica
Aceite de Oliva
Tampón pH 7,5 (17 mL) 100 mM

b) Secreción endógena

Lecitina (100 mg)
Sales Biliares (250 mg)
Colesterol (20 mg)
Tampón Triz-Mal pH 7.5 (10 mL) 100 mM
CaCl₂
NaCl

Homogeneización

Homogeneización

Homogeneización
2 min-3500 rpm

1 h- 37°C

Extracto de pancreatina (16 mg/mL)

Extracto de PLA2 (0,16mg /mL)
Extracto de Colesterol Esterasa (0,064 mg/ml)

Figura 2. Evolución del modelo de digestión, representándose a) Modelo de digestión *in vitro* inicial, b) Modelo de digestión *in vitro* final

7.1.2. Modificaciones del método de extracción de componentes lipídicos

Como se comentó anteriormente, no solamente es importante prestar atención al modelo de digestión *in vitro*, sino también a las técnicas analíticas posteriores, que van a permitir evaluar los resultados obtenidos de la hidrólisis. En concreto, es importante tener en cuenta, en primer lugar las distintas técnicas utilizadas para extraer del medio acuoso de digestión los productos lipídicos liberados de la hidrólisis, procedentes de componentes lipídicos de diferentes familias. Por ello, es de especial interés comentar las diferentes mezclas de disolventes orgánicos utilizadas en cada uno de los capítulos de la presente Tesis, en función de la familia lipídica de estudio (10).

Cuando se inició el desarrollo del primer modelo de digestión para TG en el Capítulo III, para extraer los productos de la hidrólisis del aceite de oliva, fueron necesarias diferentes pruebas de extracción lipídica, utilizando varias mezclas de disolventes de distinta polaridad con el fin de seleccionar el mejor medio y las mejores condiciones que garantizaran el mayor grado de recuperación de muestra lipídica. Se probaron los disolventes *n*-hexano, metil *ter*- butil éter, acetona, y mezclas de *n*-hexano: metil *ter*- butil éter a diferentes proporciones volumétricas (Figura 3). Además, se probaron diferente número de extracciones (1-3 extracciones sucesivas) hasta determinar la mezcla con la que mayor rendimiento se obtuvo, siendo esta la de *n*-hexano: metil *ter*- butil éter (50:50, v:v), y llevando a cabo 2 extracciones sucesivas sobre la muestra con esta mezcla (98% de recuperación).

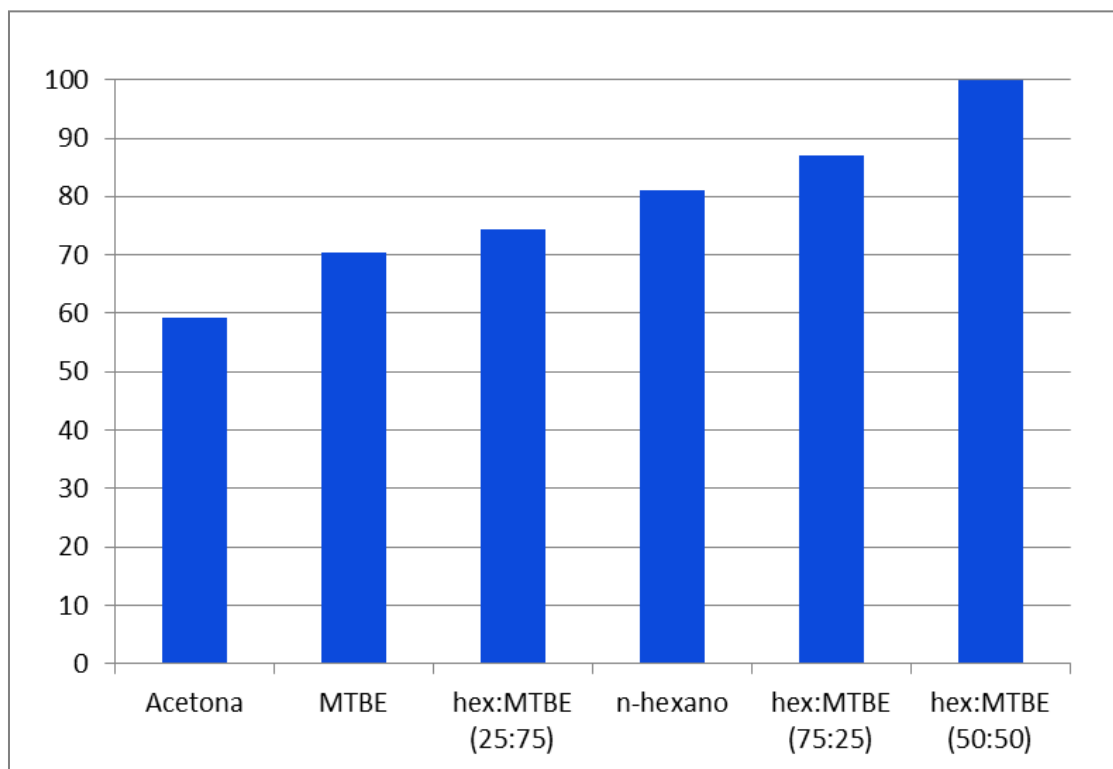


Figura 3. Porcentajes de recuperación con las distintas mezclas de disolventes testadas después de dos ciclos de extracción en cada caso

Cuando este procedimiento desarrollado para TG fue aplicado posteriormente en los estudios del Capítulo III para el análisis de los respectivos productos de hidrólisis de TB y D-SCAKG, también fueron necesarias diferentes modificaciones del proceso de extracción, debido a que el ácido butírico liberado durante la digestión no se podía extraer eficientemente con la mezcla elegida para el aceite de oliva. Entre las pruebas llevadas a cabo se encontró como método más adecuado la acidificación mediante HCl (11) del medio de digestión antes de llevar a cabo la extracción lipídica. Este paso era necesario para evitar la parcial disociación del ácido butírico y así poder extraerlo de forma cuantitativa del medio de digestión para su posterior análisis y cuantificación. Por otro lado, en este caso se observó que realizando una única extracción se obtenía un porcentaje de recuperación cercano al 100%.

El método de extracción de los productos de la hidrólisis del modelo de digestión intestinal *in vitro* para digerir glicéridos parciales fue también ligeramente diferente al de los TG. La inclusión de una segunda etapa de extracción con cloroformo:metanol fue necesaria debido a que únicamente con la

mezcla de disolventes de partida no se llegaban a extraer todos los productos de la hidrólisis, debido a que las mezclas de glicéridos liberan mayores cantidades de lípidos de mayor polaridad, como son el DG y el MG. Así, se pasó de un 85% de recuperación utilizando sólo la primera etapa de extracción, a casi un 96% de recuperación llevando a cabo las dos etapas comentadas.

En el caso del método de extracción de los productos de la hidrólisis de PS de nuevo se pudo comprobar que el método de extracción desarrollado para TG en el Capítulo III no logró alcanzar un porcentaje de extracción adecuado, obteniendo valores cercanos al 70 %. Por este motivo se llevaron a cabo diferentes pruebas, basándose en métodos previamente descritos en la bibliografía más específicos para esteroides y ésteres de esteroide (12). Alguna de las mezclas de extracción que se probaron se detallan en la figura 4. El porcentaje de recuperación de la mezcla de disolventes seleccionada fue próxima al 98%.

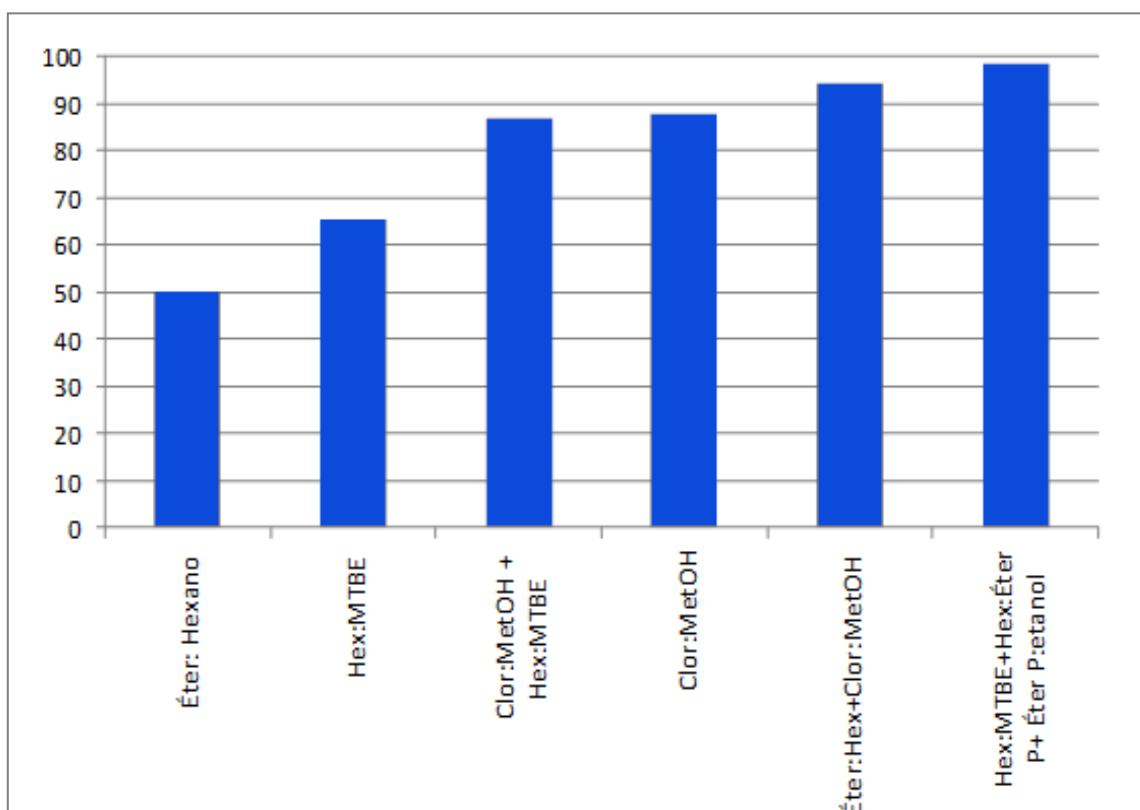


Figura 4. Porcentajes de recuperación con las distintas mezclas de disolventes testadas después de dos ciclos de extracción en cada caso

Finalmente, en el caso de la extracción de los productos de la hidrólisis de los PLs se encontraron ciertas dificultades en la extracción debido a la polaridad de los

productos de la hidrólisis, especialmente del liso-PHT. Además, de nuevo en este caso se hizo necesaria una acidificación del medio, de acuerdo a otros métodos de extracción previamente descritos en la bibliografía (13) o desarrollados por miembros del grupo de investigación IAF-UAM (14). Se probaron diferentes proporciones de cloroformo: metanol, añadiendo distintas cantidades de dos ácidos, fórmico y fosfórico. El ácido fosfórico permitió disolver el liso-PHT en la mezcla final de disolventes y productos de la hidrólisis, sin formar precipitados ni enturbiar la mezcla de disolventes, tal y como sucedía en ausencia de acidificación. Finalmente, se comprobó que el porcentaje de recuperación de productos era cercano al 94%

7.1.3. Modificaciones del método analítico

Es importante señalar que dependiendo de la especie lipídica estudiada, así como el objetivo buscado, fue necesario en algunos casos utilizar métodos analíticos diferentes, los cuales se van a comentar brevemente, haciendo referencia a la causa que justificó dichos cambios.

A lo largo de varios capítulos (III, IV y VI), se ha mostrado como la metodología analítica más habitual utilizada para los productos de la hidrólisis de naturaleza neutra (TG, DG, MG, FFA) fue HPLC con detector de ELSD, aplicando un método analítico que había sido previamente desarrollado por miembros del grupo de investigación IAF-UAM (15).

Sin embargo, en el caso del análisis de los productos de la hidrólisis de la TB y del D-SCAKG, este se llevó a cabo mediante GC-FID (16). A pesar de tratarse de productos de hidrólisis también de naturaleza neutra, se utilizó una técnica y un detector diferente debido a la volatilidad del producto de hidrólisis mayoritario de ambos sustratos, el ácido butírico. El detector utilizado en HPLC es un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) que se caracteriza porque volatiliza completamente la fase móvil en una cámara de nebulización, por lo que en dicho proceso volatilizaría también compuestos como el ácido butírico que finalmente no sería detectable por el equipo.

Por otro lado, para analizar los productos de la hidrólisis liberados durante la digestión de los PS se utilizó igualmente un equipo de GC-FID acoplado además a un detector MS (16). En este caso, se utilizó GC debido a que la columna de sílice utilizada en los análisis por HPLC no es capaz de separar los distintos esteroides y ésteres de esteroles que formaban parte de los productos de la hidrólisis. Como ya se comentó en el capítulo V, esta diferente composición de ambos sustratos de estudio permitió poder explicar el distinto comportamiento durante la digestión *in vitro* de los dos PS. Por otro lado, el detector MS permitió verificar la identificación correcta de cada uno de los picos del cromatograma en función de su espectro de masas.

Por último, se llevó a cabo el análisis más complejo para el caso de los estudios desarrollados en el Capítulo VI para PL y PHT, debido a la coexistencia de lípidos polares y neutros en la misma muestra, y siendo todos ellos necesarios analizar para conseguir los objetivos planteados en el estudio. Por un lado, para analizar los lípidos de naturaleza neutra, se utilizó la misma metodología descrita anteriormente mediante HPLC-ELSD. Por otro lado, para analizar los lípidos de naturaleza polar, se partió de un método analítico desarrollado previamente por miembros del grupo de investigación IAF-UAM para PL y PHT (14), pero sobre el cuál fue necesario llevar a cabo ciertos cambios que permitieran un adecuado análisis de los productos de digestión, principalmente liso-PHT. Es importante recordar además, que previamente fue necesario llevar a cabo la purificación de un patrón de liso-PHT para poder cuantificar este compuesto en el medio de digestión.

7.2. APLICACIÓN DE MODELOS DE DIGESTIÓN *IN VITRO* EN LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOACTIVO DE LÍPIDOS

A lo largo de los ensayos de desarrollo y aplicación de modelos de digestión *in vitro* realizados en esta Tesis se ha podido estudiar uno de los aspectos fundamentales planteados para todos los lípidos de interés, conocer su comportamiento durante la digestión, así como la bioaccesibilidad de cada uno de ellos. Pero adicionalmente, a lo largo de los distintos capítulos, gracias a la aplicación de los modelos de digestión desarrollados, se han podido estudiar otros

aspectos adicionales al proceso digestivo. Estos otros aspectos han estado más cercanos con la evaluación de la potencial bioactividad de cada uno de los compuestos lipídicos estudiados. Es por ello que en el presente apartado se pretende hacer una discusión conjunta de las distintas aplicaciones y usos que se han podido obtener a partir de los modelos de digestión desarrollados, independientemente del lípido en cuestión, como son los siguientes:

✓ **Aplicación de modelos de digestión en la evaluación de la digestión y bioaccesibilidad**

Tras el desarrollo de los distintos modelos de digestión *in vitro* llevados a cabo en los diferentes capítulos de la presente Tesis, la primera aplicación de los modelos que se realizó fue evaluar en detalle el comportamiento digestivo de cada uno de los lípidos de interés (D-SCAKG, glicéridos parciales, PS-CLA y PHT).

Realizando una comparativa conjunta de estos productos experimentales, se pudo observar que todos los sustratos de estudio fueron reconocidos por las enzimas digestivas correspondientes, aunque en mayor o menor medida, alcanzando grados de hidrólisis en algunos casos comparables a los lípidos análogos de referencia, y en otros casos mostrando un comportamiento diferente a dichos lípidos control. Así, se mostró cómo los TG (tanto de aceite de oliva como TB) eran hidrolizados por la lipasa pancreática, más eficientemente y de una manera diferente a como sucedió con el producto experimental de D-SCAKG, el cual presentaba como producto mayoritario el compuesto alquilglíerol monoesterificado (M-SCAKG), mientras que en el caso de los TG el producto mayoritario eran los FFA. De igual modo, el grado y velocidad de hidrólisis del producto experimental PHT fue inferior al PL control de referencia. Por el contrario, el producto de síntesis PS-CLA mostró un comportamiento muy similar al control PS-C; y en el caso del estudio de aplicación llevado a cabo en glicéridos parciales, incluso se demostró cómo el grado y velocidad de hidrólisis de estos sustratos fue superior al lípido control de referencia en forma de TG.

Por otro lado, en cuanto a la aplicación de los modelos desarrollados para evaluar la bioaccesibilidad de los lípidos de estudio, se pudo comprobar que la mayor parte de los productos de la hidrólisis de los diferentes sustratos mostraron una buena bioaccesibilidad, siendo por lo general similar a la de los lípidos utilizados como estándar para cada uno de los lípidos experimentales. No obstante, en algunos casos particulares se observaron ciertas diferencias. Por ejemplo, para el caso de los productos de digestión de D-SCAKG se pudo demostrar que su bioaccesibilidad era limitada si no se acompañaba de otros lípidos en el medio. Igualmente, para el caso de los productos de digestión de PHT, parte del PHT no hidrolizado mostró una limitada bioaccesibilidad. Por el contrario, en el caso del PS-CLA, este mostró una bioaccesibilidad comparable al PS-C; y en el caso del estudio de glicéridos parciales, la bioaccesibilidad fue incluso superior a los TG control de referencia.

✓ **Aplicación de modelos de digestión en la evaluación de la bioactividad en células intestinales**

La aplicación del modelo de digestión *in vitro* desarrollado permitió estudiar la potencial bioactividad del D-SCAKG relacionada con su actividad anticancerígena sobre un modelo celular. Asimismo, con la aplicación de este modelo de digestión y su posterior combinación con el modelo celular tumoral se pudo conocer qué componentes liberados de la hidrólisis fueron los principales responsables de llevar a cabo la potencial actividad anticancerígena del D-SCAKG.

Sin embargo, independientemente del efecto bioactivo del producto D-SCAKG, en este apartado resulta relevante destacar que gracias a la aplicación del modelo de digestión se pudieron demostrar dos aspectos fundamentales: 1) que tanto la digestión previa del producto, como 2) su inclusión en estructuras micelares, fueron necesarios para evidenciar una bioactividad.

Por tanto, la aplicación del modelo *in vitro* llevada a cabo demostró la importancia que tiene el hecho de que un potencial lípido bioactivo se vea sometido al proceso de digestión previo cuando lo que se quiere es evaluar el efecto bioactivo que tendrá después de su ingesta. Estos datos resultan además muy relevantes dado que, principalmente, lo que se encuentra descrito en la

bibliografía en cuanto a lípidos bioactivos, son estudios de bioactividad en cultivos celulares con la adición directa del componente lipídico al medio de cultivo, sin haber considerado y evaluado el paso previo de hidrólisis que sufriría dicho lípido tras una administración oral, con la consecuente degradación hacia productos de digestión que serían los potencialmente bioactivos, así como la distribución física en la que se encontrarían en forma micelada.

✓ **Aplicación de modelos de digestión en la selección de glicéridos parciales con fines diferentes**

Otra de las aplicaciones diferentes que permitió la aplicación del modelo de digestión *in vitro* fue la posibilidad de seleccionar distintos glicéridos parciales o sus mezclas en base a diferentes fines: 1) glicéridos parciales como agentes hipocalóricos u otras bioactividades, 2) glicéridos parciales como sistemas autoemulsionables para la formulación de vehículos lipídicos, y 3) combinación de ambos efectos.

En concreto, gracias a la aplicación del modelo *in vitro* desarrollado, y centrándose en el estudio detallado de la proporción de las especies liberadas 1-MG y 2-MG, así como el ratio entre estos dos productos, junto con la capacidad de formación de estructuras micelares, se pudo razonar qué forma glicérida sería más idónea para cada una de las finalidades descritas.

✓ **Aplicación de modelos de digestión en la evaluación del efecto hipocolesterolémico**

Mediante la aplicación del modelo de digestión *in vitro* previamente desarrollado para ST, se pudo evaluar el potencial hipocolesterolémico del producto experimental PS-CLA. En concreto, la aplicación del modelo permitió indagar en uno de los mecanismos específicos de acción de los PS: el desplazamiento del Cho de la fase bioaccesible micelar.

Adicionalmente, gracias a la aplicación del modelo de digestión *in vitro*, e independientemente de la magnitud del efecto hipocolesterolémico obtenido, se han podido estudiar determinados mecanismos de acción que pueden tener

lugar durante la digestión intestinal de esta forma esterificada de PS con CLA y su acción sobre el desplazamiento de Cho; así como la implicación que pueden tener las distintas formas de PS presentes en el medio, o los propios ácidos grasos esterificados.

✓ **Aplicación de modelos de digestión en la evaluación del efecto del proceso digestivo sobre la actividad antioxidante**

En los apartados anteriores se han ido demostrando distintas aplicaciones del modelo de digestión *in vitro* relacionadas con la evaluación de la potencial bioactividad de los distintos lípidos de estudios. Finalmente, en el capítulo VI, se llevó a cabo la aplicación del modelo de digestión *in vitro* con una finalidad algo diferente a las mostradas hasta ahora, ya que se trató de evaluar fundamentalmente, no la bioactividad por sí misma, sino el efecto que podrían tener sobre la bioactividad las propias condiciones del proceso de digestión. Sería esta por tanto, otra aplicación adicional que permitirían los modelos de digestión desarrollados.

En concreto, se determinó el cambio en la actividad antioxidante del producto experimental PHT tras el tiempo final de digestión. Así, gracias a la aplicación del modelo de digestión más allá del simple estudio de la digestión, se pudo evidenciar que el producto digerido PHT presentó una mejor actividad antioxidante que el producto antes de digerir.

Por tanto, al igual que se demostró en el caso del estudio llevado a cabo con el producto D-SCAKG en cultivos celulares, de nuevo los resultados obtenidos de esta aplicación indicaron la importancia de llevar a cabo previamente un proceso de digestión *in vitro* en el estudio de la potencial bioactividad de un determinado producto, permitiendo estudiar además el efecto del proceso de digestión de un determinado compuesto sobre su potencial bioactividad.

7.3. BIBLIOGRAFÍA

(1) Ravi Devraj, Hywel D. Williams, Dallas B. Warren, Kazi Mohsin, Christopher J.H. Porter, Colin W. Pouton, (2013) In vitro assessment of drug-free and fenofibrate-

containing lipid formulations using dispersion and digestion testing gives detailed insights into the likely fate of formulations in the intestine, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49, 748-760

(2) Borgström B. Luminal digestion of fats. In: Go VLW, Dimagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA, editors. (1993) The pancreas: biology, pathobiology, and disease, *New York: Raven Press*, 475-488.

(3) Denke, M. A. Lack of efficacy of low-dose sitostanol therapy as an adjunct to a cholesterol-lowering diet in men with moderate hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.* (1995), 61, 392-396.

(4) Jones, P. J. H.; Vanstone, C. A.; Raeini-Sarjaz, M.; St-Onge, M. Phytosterols in low- and nonfat beverages as part of a controlled diet fail to lower plasma lipid levels. *Journal of Lipid Reseach* (2003), 44, 1713-1719.

(5) Brown, A. W.; Hang, J.; Dussault, P. H.; Carr, T. P. Phytosterol ester constituents affect micellar cholesterol solubility in model bile. *Lipids*. (2010), 45, 855-862.

(6) Martin C Carey (1983) Lipid digestión and absorption, *Annual Review of Physiology*, 45, 651-677

(7) Selena Di Maio, Rebecca L. Carrier (2011) Gastrointestinal contents in fasted state and post-lipid ingestion: In vivo measurements and in vitro models for studying oral drug delivery *Journal of Controlled Release*, 151, 110-122

(8)NR Pattinson, BA Chapman (1986) Distribution of biliary cholesterol between mixed micelles and nonmicelles in relation to fasting and feeding in humans, *Gastroenterology*

(9) Sophie Gallier , Jack Cui, Trent D. Olson, Shane M. Rutherford, Aiqian Ye, Paul J. Moughan, Harjinder Singh (2013) In vivo digestion of bovine milk fat globules: Effect of processing and interfacial structural changes. I. Gastric digestion *Food Chemistry*, 141, 3273-3281

(10) E. G. Bligh, W. J. Dyer (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911-917,

- (11) Leab Sek, Christopher J.H Porter, William N Charman (2001) Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 651-661
- (12) J Folch, M Lees, H Sloane Stanley (1956) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *The Journal of Biological Chemistry*, 499-509
- (13) Ladislav Kolarovic, Nestor C. Fournier (1986) A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources, *Analytical Biochemistry* 156, 244-250
- (14) Casado V, Reglero G, Torres CF. (2014) Novel and efficient solid to solid transphosphatidylation of two phenylalkanols in a biphasic GRAS medium. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 99, 14-19.
- (15) Torres, C., Vazquez, L., Senorans, F., Reglero, G. (2005). Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector. *J Chromatogr A*. 2005, 1078, 28-34.
- (16) Torres, C., Tenllado, D., Senorans, F., Reglero, G. (2009). A versatile GC method for the analysis of alkylglycerols and other neutral lipid classes. *Chromatographia*, 69, 729-734.

CAPÍTULO VIII

CAPÍTULO VIII: “CONCLUSIONES GENERALES”

A lo largo de los diferentes capítulos que conforman la presente Tesis se han comentado las conclusiones específicas de cada uno de los trabajos llevados a cabo. En este apartado se describirán las conclusiones generales derivadas de todo el trabajo desarrollado en la presente Tesis.

1. Se han desarrollado diferentes modelos de digestión intestinal *in vitro* para la evaluación del proceso de digestión intestinal de tres formas lipídicas diferentes: glicéridos, fitosteroles y fosfolípidos.
2. La aplicación de estos modelos ha permitido el estudio tanto del proceso de digestión como de la potencial bioaccesibilidad de las tres formas lipídicas de estudio.
3. Los modelos *in vitro* desarrollados son capaces de reproducir resultados fisiológicos similares a los descritos *in vivo* en cuanto al grado de digestión y bioaccesibilidad, tanto de glicéridos, como de fitosteroles y fosfolípidos.
4. La aplicación de los modelos desarrollados ha permitido conocer que alquilglicerol esterificados con ácido butírico y fosfolípidos esterificados con hidroxitirosol se digieren en menor medida que sus formas análogas en forma de glicéridos o fosfolípidos, respectivamente. Por el contrario, la digestión de fitosteroles esterificados con CLA es comparable a la de formas análogas de fitosteroles; y la digestión de glicéridos parciales resulta superior a formas de triglicéridos de referencia.
5. En cuanto a la bioaccesibilidad, la aplicación de los modelos desarrollados ha permitido conocer que simulando una situación de co-ingesta con los lípidos habituales de la dieta, todas las formas lipídicas de síntesis evaluadas presentan una buena bioaccesibilidad.

6. Por otro lado, la aplicación de los modelos de digestión intestinal *in vitro* ha permitido también evaluar los siguientes aspectos:

6.1. La mezcla de productos de digestión generados a partir de alquilglicerol esterificadas con ácido butírico muestran un potencial efecto antiproliferativo en células intestinales, habiéndose demostrado además la importancia de que estos productos se encuentren incluidos en las formas micelares bioaccesibles.

6.2. Las mezclas de glicéridos parciales a base de 1(3)-diglicéridos/1-monoglicéridos resultan de gran interés tras el proceso digestivo por aunar potenciales efectos bioactivos, una buena capacidad autoemulsionable, y la ventaja económica adicional que supone la obtención de esta mezcla lipídica.

6.3. Los fitosteroles esterificados con CLA muestran un potencial efecto hipocolesterolémico a nivel de desplazamiento del colesterol micelar durante el proceso de digestión, con la ventaja adicional de vehicular el ácido graso bioactivo CLA.

6.4. El producto de digestión mayoritario del lípido de síntesis fosfatidilhidroxitirosol, el liso-fosfatidilhidroxitirosol, podría ser de mayor interés bioactivo que el producto sin digerir ya que presenta una mayor actividad antioxidante tras el proceso de digestión.

7. Por último, entendiendo las limitaciones que suponen los modelos *in vitro*, los resultados obtenidos únicamente se pueden considerar preliminares u orientativos, y en cualquier caso serían necesarios ensayos adicionales en condiciones *in vivo* con el fin de validar tanto los resultados relativos al comportamiento digestivo de los distintos lípidos de síntesis, así como aquellos indicios obtenidos en cuanto a su bioactividad.

ANEXO

En el siguiente Anexo se detalla la producción científica a la que ha dado lugar la presente Tesis, tanto en forma de artículos en revistas científicas indexadas, así como comunicaciones a congresos.

Producción científica relacionada

Artículos científicos

1. D. Martin, M.I. Moran-Valero, F.J. Señoráns, G. Reglero, C.F. Torres. In vitro intestinal bioaccessibility of alkylglycerols versus triacylglycerols as vehicles of butyric acid. *Lipids*, 46, 277-285. **2011**
2. M.I. Moran-Valero, D. Martin, G. Torrelo, G. Reglero, C.F. Torres. Phytosterols Esterified with Conjugated Linoleic Acid. In Vitro Intestinal Digestion and Interaction on Cholesterol Bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 11323-11330. **2012**
3. S. Molina, M.I. Moran-Valero, D. Martin, L. Vázquez, T. Vargas, C.F. Torres, A. Ramírez de Molina, G. Reglero. Antiproliferative effect of alkylglycerols as vehicles of butyric acid on colon cancer cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, 175, 50-56. **2013**
4. D. Martin, M.I. Moran-Valero, L. Vázquez, G. Reglero, C.F. Torres. Comparative in vitro intestinal digestion of 1, 3-diglycerides and 1-monoglycerides rich oils and their mixtures. *Food Research International*, 64, 603-609. **2014**
5. D. Martin, M.I. Moran-Valero, V. Casado, G. Reglero, C.F. Torres. Phosphatidyl Derivative of Hydroxytyrosol. In Vitro Intestinal Digestion, Bioaccessibility, and Its Effect on Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9751-9759. **2014**

Comunicaciones a congresos

1. M.I. Moran-Valero, D. Martin, V. Casado, G. Reglero, C.F. Torres. Development of an in vitro model of intestinal digestion of phospholipids. Poster. 3th International Conference on Food Digestion. Wageningen (Holanda). **2014**
2. M.I. Moran-Valero, D. Martin, V. Casado, G. Reglero, C.F. Torres. Digestión y bioaccesibilidad in vitro de fosfatidilhidroxitirosol. Comunicación oral. 1th CIAL Forum. Madrid (España). **2014**
3. M.I. Moran-Valero, S. Molina, D. Martín, T. Vargas, C.F. Torres, A. Ramírez de Molina, G. Reglero. In vitro bioaccessibility and antiproliferative bioactivity of alkylglycerols as vehicles of butyric acid. Poster. 2nd International Conference on Food Digestion. Madrid (España). **2013**

Otra producción científica**Artículo de revisión científica**

C.F. Torres, D. Martin, G. Torrelo, V. Casado, O. Fernández, D. Tenllado, L. Vázquez, M.I. Moran-Valero, G. Reglero. Lipids as delivery systems to improve the biological activity of bioactive ingredients. *Current Nutrition and Food Science*, 7, 160-169. **2011**